

BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL

COORDENADORES:

WALTER BORZANI

WILLIBALDO SCHMIDELL

URGEL DE ALMEIDA LIMA

EUGÊNIO AQUARONE

VOLUME I

FUNDAMENTOS



EDITORA EDGARD BLÜCHER LTDA

Coordenadores:

WALTER BORZANI
WILLIBALDO SCHMIDELL
URGEL DE ALMEIDA LIMA
EUGÊNIO AQUARONE

BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL

VOLUME I

FUNDAMENTOS



**EDITORA
BLUCHER**

50 anos

www.blucher.com.br

© 2001 Walter Borzani
Willibaldo Schmidell
Urgel de Almeida Lima
Eugênio Aquarone

2ª reimpressão – 2008

*É proibida a reprodução total ou parcial
por quaisquer meios
sem autorização escrita da editora*

EDITORA BLUCHER

Rua Pedroso Alvarenga, 1245 – 4º andar

04531-012 – São Paulo, SP – Brasil

Fax: (11) 3079-2707

Tel.: (11) 3078-5366

e-mail: editora@blucher.com.br

site: www.blucher.com.br

ISBN 978-85-212-0278-3

FICHA CATALOGRÁFICA

Borzani, Walter

Biotechnologia industrial / Walter Borzani - outros coordenadores: Willibaldo Schmidell, Urgel de Almeida Lima, Eugênio Aquarone -- São Paulo: Blucher, 2001.

Bibliografia.

ISBN 978-85-212-0278-3

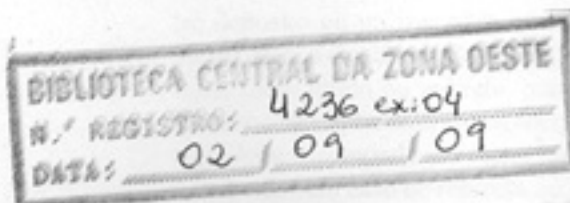
1. Biotechnologia 2. Biotechnologia industrial 3. Microbiologia industrial 4. Microorganismos biotecnológicos I. Borzani, Walter II. Schmidell, Willibaldo III. Lima, Urgel de Almeida IV. Aquarone, Eugênio

05-0906

CDD-606.6

Índices para catálogo sistemático:

1. Biotechnologia Industrial: Engenharia química 606.6



660.6
B615
ex:04

phl 004378

APRESENTAÇÃO

Este conjunto de quatro volumes, reunidos sob o título amplo de BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL, é o resultado do trabalho de um grupo de profissionais com vistas à atualização da coleção BIOTECNOLOGIA, cuja publicação foi iniciada em 1975 e terminada em 1983.

A experiência acumulada e as muitas mudanças ocorridas nestes últimos vinte anos, ao lado da indiscutível e crescente importância das aplicações da BIOTECNOLOGIA em diversos setores de produção de bens e serviços, justificam plenamente — assim pensam os Coordenadores e o Editor desta nova Coleção — esta primeira atualização, principalmente pelo fato de se destinar ao ensino em cursos de graduação.

Nosso primeiro objetivo, nesta Apresentação, é tomar conhecimento do que, hoje, se entende por BIOTECNOLOGIA, e do que vem a ser BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL.

A demarcação nítida do campo de atuação de qualquer ramo do conhecimento é sempre tarefa muito difícil, para não dizer impossível.

Tanto isto é verdade que, com certa frequência, tratados relativos a um dado setor do conhecimento atacam diretamente o exame de uma série de temas sem tentar esboçar, preliminarmente, um quadro que, em largos traços, indique os objetivos e as aplicações do que vai ser estudado.

Tal maneira de agir, principalmente em cursos de graduação, não nos parece aconselhável. Julgamos importante, no início dos estudos, a apresentação de um panorama que dê, aos alunos, uma idéia, ainda que não bem definida, daqueles objetivos e aplicações.

Não nos parece que seja imprescindível transcrever, aqui, todas as propostas de “definição” do que se deva entender por Biotecnologia. Algumas delas serão suficientes para que seja possível alcançar nosso objetivo.

Iniciaremos com a proposta que o Prof. Antonio Paes de Carvalho, em seu trabalho intitulado “Patentes para a Biotecnologia”, apresentou, em dezembro de 1993, em reunião realizada na Academia Brasileira de Ciências:

“Entende-se por Biotecnologia o conjunto de conhecimentos, técnicas e métodos, de base científica ou prática, que permite a utilização de seres vivos como parte integrante e ativa do processo de produção industrial de bens e serviços”.

O Office of Technology Assessment, por sua vez, "definiu" Biotecnologia como sendo:

"O conjunto de processos industriais que englobam processos biológicos".

Por outro lado, a Union Internationale de Chimie Pure et Appliquée, conceituou Biotecnologia como:

"Aplicação da Bioquímica, da Biologia, da Microbiologia e da Engenharia Química aos processos e produtos industriais (incluindo os produtos relativos à saúde, energia e agricultura) e ao meio ambiente".

Finalmente, o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), em seu Programa Nacional de Biotecnologia, "definiu" Biotecnologia nos seguintes termos:

"A utilização de sistemas celulares para obtenção de produtos ou desenvolvimento de processos industriais".

As poucas tentativas de definição aqui transcritas mostram, nitidamente, que a Biotecnologia tem por base vários ramos do conhecimento que poderiam ser classificados de FUNDAMENTAIS (como, por exemplo, Bioquímica, Fisiologia, Genética, Microbiologia, Virologia, Botânica, Zoologia, Ecologia) ao lado de outros que poderiam ser agrupados sob a denominação genérica de ENGENHARIAS (principalmente a Engenharia Química).

Trata-se, portanto, de um campo de trabalho tipicamente multidisciplinar, o que torna absolutamente imprescindível a efetiva colaboração de profissionais atuantes em diferentes setores do conhecimento.

Destaque-se, porém, que essa atividade multidisciplinar não deve ser entendida como resultante de uma simples justaposição de profissionais, cada um deles com sua formação especializada e preocupado apenas com sua área específica. Importa que seja, de fato, um trabalho de vários profissionais efetivamente integrados, de modo que cada um deles tenha conhecimento, obviamente não aprofundado, dos princípios e das técnicas dos campos de atuação dos demais. Assim, apenas para citar um exemplo, caso um microbiologista participe de um grupo que estuda a otimização de um dado processo, é desejável que tenha alguns conhecimentos, mesmo que superficiais, a respeito das estratégias empregadas para a modelagem matemática. Vice-versa, o especialista em modelagem deve efetuar um esforço adicional para compreender as características do sistema microbiano em estudo, a fim de incorporá-las ao modelo. Somente desta forma a atividade multidisciplinar efetivamente existirá e poderá ser mais eficiente.

Se é verdade, por um lado, que a Biotecnologia só passou a ser considerada altamente prioritária há relativamente pouco tempo, também é verdade, por outro, que processos biotecnológicos vêm sendo utilizados na produção de vários bens, principalmente alimentos, desde a mais remota antiguidade. Basta, neste particular, fazer referência ao preparo de bebidas fermentadas a partir de cereais na Babilônia e no Egito (8.000 a 6.000 anos a.C.), à produção de pão, utilizando fermentos, no Egito (4.000 anos a.C.) e à produção de vinhos na Grécia (2.000 a.C.).

A Biotecnologia encontra muitas aplicações importantes nas seguintes áreas de atividade:

- Agricultura
- Pecuária
- Saúde
- Preservação do meio ambiente
- Indústria

Suas aplicações na indústria constituem o objetivo primordial da Biotecnologia Industrial. A Fig. 1, adaptada de um artigo publicado pelo Prof. Rainer Jonas, é uma boa representação gráfica da "localização" da Biotecnologia Industrial e de sua interação com outros ramos do conhecimento.

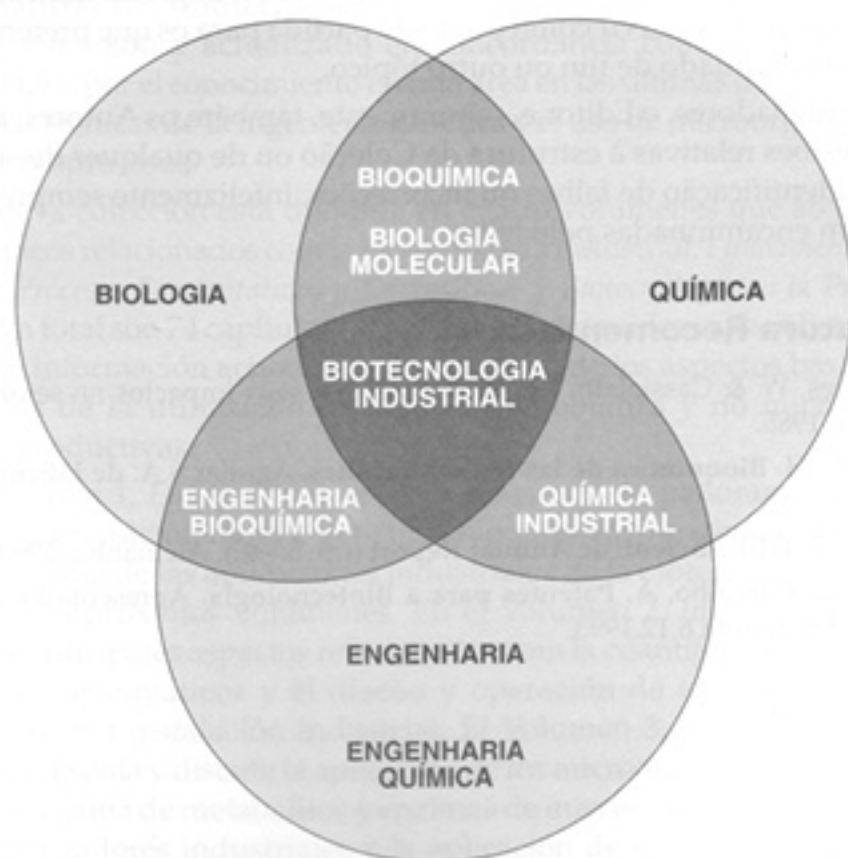


Figura 1 — Representação esquemática da interação da Biotecnologia Industrial com outros ramos do conhecimento.

Convém, finalmente, ressaltar que, como ocorre em outros campos de trabalho, as áreas de aplicação da Biotecnologia, anteriormente apontadas, não são "gavetas" estanques. Há entre elas, freqüentemente, fortes interações. Apenas para citar um exemplo, considere-se o caso de uma dada vacina, desenvolvida na área da Saúde. Na etapa final de produção dessa vacina em larga escala surgirão, muito provavelmente, problemas de cunho tecnológico e de engenharia que poderão tornar imprescindível a efetiva participação da Biotecnologia Industrial na busca das soluções mais adequadas.

A presente Coleção consta de quatro volumes. No primeiro — FUNDAMENTOS — reúnem-se, como o próprio nome claramente indica, temas fundamentais indispensáveis ao estudo de processos biotecnológicos. O segundo — ENGENHARIA BIOQUÍMICA — focaliza os principais problemas de engenharia envolvidos naqueles processos, ao lado de assuntos correlatos de âmbito mais geral, mas importantes na produção em larga escala. Os dois últimos volumes — PROCESSOS FERMENTATIVOS E ENZIMÁTICOS e BIOTECNOLOGIA NA PRODUÇÃO DE ALIMENTOS — foram dedicados à descrição e discussão de processos biotecnológicos de importância industrial.

Todos os temas foram tratados partindo-se do pressuposto de que a obra se destina, primordialmente, a cursos de graduação. A bibliografia indicada no final de cada capítulo poderá servir como ponto de partida para os que pretenderem um exame mais aprofundado de um ou outro tópico.

Os Coordenadores, o Editor e, seguramente, também os Autores, agradecem todas as sugestões relativas à estrutura da Coleção ou de qualquer de suas partes, bem como a identificação de falhas ou incorreções, infelizmente sempre possíveis, que lhes sejam encaminhadas pelo leitor.

Literatura Recomendada

- 1) Anciães, W. & Cassiolato, J.E. **Biotecnologia: seus impactos no setor industrial.** CNPq, Brasília, 1985.
- 2) Haehn, H. **Bioquímica de las fermentaciones.** Aguilar S.A. de Ediciones, Madri, 1956.
- 3) Jonas, R. GBF - Scientific Annual Report (pp. 35-46). Alemanha, 1990.
- 4) Paes de Carvalho, A. **Patentes para a Biotecnologia.** Apresentado à Academia Brasileira de Ciências em 6.12.1993.

PREFÁCIO

Cuando la colección "Biotecnologia", editada por los profesores Eugênio Aquarone, Walter Borzani y Urgel de Almeida Lima, apareció en 1975, causó un hondo impacto entre los biotecnólogos latinoamericanos. Se trató de la primera obra sobre el tema escrita y publicada en nuestra región y representó una contribución especialmente valiosa al estudio y enseñanza de esa pujante disciplina.

"Biotecnologia" constó originalmente de tres volúmenes: *Tecnologia das Fermentações*, *Tópicos de Microbiologia Industrial* y *Engenharia Bioquímica*, a los cuales se sumó en 1981 *Corrosão Microbiológica* y luego *Alimentos e Bebidas produzidos por Fermentação* en 1983. Ahora, pasados ya más de veinte años, los mismos editores, con la participación del profesor Willibaldo Schmidell, nos brindan la oportunidad de apreciar y disfrutar la nueva colección "Biotecnologia Industrial" como una sucesora natural de "Biotecnologia". El contenido de la nueva obra ha sido totalmente renovado y actualizado en concordancia con los notables avances experimentados por el conocimiento en esta área en las últimas décadas, incluyendo las modernas técnicas de la ingeniería genética y el uso de microorganismos recombinantes en bioprocesos.

La nueva colección está dividida en cuatro volúmenes que abarcan los mas variados tópicos relacionados con la biotecnología industrial: *Fundamentos*, *Ingeniería Bioquímica*, *Procesos Fermentativos y Enzimáticos* y *Biotecnología en la Producción de Alimentos*. En total son 74 capítulos escritos por distinguidos especialistas brasileiros, conteniendo información actualizada acerca tanto de los aspectos básicos como de los aplicados de la utilización de células microbianas y no microbianas para finalidades productivas.

El Volumen 1, *Fundamentos*, entrega un completo panorama del estado del conocimiento en microbiología, genética, bioquímica y enzimología, finalizando con un panorama de las aplicaciones industriales de la biotecnología, abriendo así el camino a los próximos volúmenes. En el Volumen 2, *Ingeniería Bioquímica*, se exponen los principales aspectos relacionados con la cuantificación de los procesos microbianos y enzimáticos y el diseño y operación de los equipos de proceso requeridos en una instalación industrial. El Volumen 3, *Procesos Fermentativos y Enzimáticos*, presenta y discute la aplicación de los microorganismos a la producción de una amplia gama de metabolitos y enzimas de interés práctico, el uso de enzimas como biocatalizadores industriales y la aplicación de los procesos microbianos a diversos sectores industriales y a la descontaminación de efluentes líquidos y residuos sólidos. Finalmente, el Volumen 4, *Biotecnología en la Producción de Alimentos*,

detalla la aplicación de la biotecnología a una amplia variedad de industrias de ese importante sector.

Por su estructura y contenido, y por la indiscutible autoridad de sus editores y autores, estoy cierto que Biotecnología Industrial está destinada a constituirse en una obra insustituible para la enseñanza universitaria de pre y post-grado, así como también en una valiosa fuente de consulta para el biotecnólogo en la industria.

Fernando Acevedo

Profesor

Escuela de Ingeniería Bioquímica
Universidad Católica de Valparaíso
Valparaíso, Chile

AUTORES

Ana Clara Guerrini Schenberg*Professora Doutora*

Universidade de São Paulo
Instituto de Ciências Biomédicas
Av. Prof. Lineu Prestes, 1374
05508-900, São Paulo, SP, Brasil

Bayardo Baptista Torres*Professor Doutor*

Universidade de São Paulo
Instituto de Química
Av. Prof. Lineu Prestes, 748
05508-900, São Paulo, SP, Brasil

Flávio Alterthum*Professor Titular*

Universidade de São Paulo
Instituto de Ciências Biomédicas
Av. Prof. Lineu Prestes, 1374
05508-900, São Paulo, SP, Brasil

João Lúcio de Azevedo*Professor Titular*

Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz
de Queiroz"
Caixa Postal 9
13418-900, Piracicaba, SP, Brasil

Luiz Carlos Basso*Professor Doutor*

Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz
de Queiroz"
Caixa Postal 9
13418-900, Piracicaba, SP, Brasil

Luiz Eduardo Gutierrez*Professor Titular*

Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz
de Queiroz"
Caixa Postal 9
13418-900, Piracicaba, SP, Brasil

Maria Ligia C. Carvalho*Professora Doutora*

Universidade de São Paulo
Instituto de Ciências Biomédicas
Av. Prof. Lineu Prestes, 1374
05508-900, São Paulo, SP, Brasil

Otto Jesu Crocomo*Professor Titular*

Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz
de Queiroz"
Caixa Postal 9
13418-900, Piracicaba, SP, Brasil

Walter Borzani*Professor Pleno*

Centro Universitário do Instituto
Mauá de Tecnologia
Escola de Engenharia Mauá
Departamento de Engenharia Química
e de Alimentos
Praça Mauá, 1
09580-900, São Caetano do Sul, SP,
Brasil

CONTEÚDO

1	ELEMENTOS DE MICROBIOLOGIA	1
1.1	Introdução à Microbiologia	1
1.2	Morfologia e estrutura	5
1.3	Nutrição microbiana	13
1.4	Meios de cultura	16
1.5	Crescimento microbiano	20
1.6	Controle dos microrganismos pela ação dos agentes físicos	27
1.7	Controle pela ação de agentes químicos	29
	Bibliografia	32
2	TÉCNICAS BÁSICAS EM MICROBIOLOGIA	33
2.1	Segurança no laboratório	33
2.2	Preparo de meios de cultura	34
2.3	Técnicas de assepsia	39
2.4	Instrumentos do microbiologista	41
2.5	Métodos de inoculação	42
2.6	Culturas puras	46
2.7	Meios de cultura e condições de incubação para anaeróbicos	47
2.8	Métodos utilizados para quantificar os microrganismos	48
2.9	Coloração de microrganismos	59
	Referências bibliográficas	60
	Leitura complementar	60
3	ELEMENTOS DE GENÉTICA DE MICRORGANISMOS	63
3.1	Introdução	63
3.2	Mutação	64
3.3	Recombinação em microrganismos	74
3.4	Herança extracromossômica em microrganismos	104
3.5	Considerações finais	109
	Referências bibliográficas	110
4	ELEMENTOS DE ENGENHARIA GENÉTICA	113
4.1	Introdução	113
4.2	Enzimas de restrição: as tesouras moleculares que cortam a molécula de DNA em pontos específicos	116
4.3	Vetores genéticos: as moléculas de DNA que veiculam a propagação dos fragmentos de DNA de interesse	120

4.4	Construção da molécula de DNA recombinante: diferentes estratégias ..	126
4.5	Expressão da informação genética heteróloga	133
4.6	Isolamento do gene clonado	137
4.7	Transformação genética da célula viva: diferentes sistemas hospedeiros do DNA recombinante	143
4.8	Questões de segurança e preservação ambiental	146
	Referências bibliográficas	148
	Leitura recomendada	150
5	ELEMENTOS DE ENZIMOLOGIA.	151
5.1	Introdução	151
5.2	Estrutura das enzimas	155
5.3	Ação catalítica das enzimas	164
5.4	Inibição da atividade enzimática	165
5.5	Regulação da atividade enzimática	166
5.6	Influência do meio sobre a atividade enzimática	168
5.7	Co-fatores e coenzimas	171
5.8	Medida da atividade enzimática	174
5.9	Classificação e nomenclatura	175
	Leituras complementares	176
6	CAMINHOS METABÓLICOS.	177
6.1	Introdução	177
6.2	Processos de obtenção de energia	178
6.3	Biossíntese	193
	Referências bibliográficas	196
7	CINÉTICA DE REAÇÕES ENZIMÁTICAS.	197
7.1	Introdução	197
7.2	Medida de velocidade	198
7.3	Influência das concentrações da enzima e do substrato Lei de Michaelis e Menten	199
7.4	Influência da presença de um inibidor	207
7.5	Influência da temperatura	213
7.6	Influência do PH	215
7.7	Comentários finais	216
	Leitura recomendada	216
8	TERMODINÂMICA DE REAÇÕES ENZIMÁTICAS.	217
8.1	Introdução	217
8.2	Princípios da termodinâmica	219
8.3	Os níveis de energia livre	234
8.4	Energética dos sistemas abertos	247
	Literatura recomendada	247
9	PROCESSO BIOTECNOLÓGICO INDUSTRIAL GENÉRICO.	249
10	ALGUMAS APLICAÇÕES INDUSTRIAIS.	253
	Literatura recomendada	254

CONTEÚDO

VOLUME 2

1	ENGENHARIA BIOQUÍMICA: UMA APLICAÇÃO <i>SUI GENERIS</i> DA ENGENHARIA QUÍMICA	1
	Literatura recomendada	3
2	MICROORGANISMOS E MEIOS DE CULTURA PARA UTILIZAÇÃO INDUSTRIAL	5
2.1	Introdução	5
2.2	Fontes de microrganismos de interesse	7
2.3	Características desejáveis de microrganismos e meios de cultura para aplicação industrial	10
2.4	Considerações finais	18
	Referências bibliográficas	18
3	ESTERILIZAÇÃO DO EQUIPAMENTO	19
3.1	Introdução	19
3.2	Terminologia e modo de atuação	20
3.3	Esterilização por agentes físicos	25
3.4	Esterilização e desinfecção por agentes químicos	33
	Referências bibliográficas	38
4	ESTERILIZAÇÃO DE MEIOS DE FERMENTAÇÃO POR AQUECIMENTO COM VAPOR	39
4.1	Introdução	39
4.2	Descrição sumária dos processos de esterilização por calor úmido	40
4.3	Cinética da destruição térmica de microrganismos	45
4.4	Destruição de nutrientes do meio como consequência da esterilização	51
4.5	Considerações gerais a respeito do cálculo do tempo de esterilização	53
4.6	Cálculo do tempo de esterilização por processo descontínuo	56
4.7	Cálculo do tempo de esterilização por processo contínuo	60
	Literatura recomendada	62
5	ESTERILIZAÇÃO DE AR	63
5.1	Introdução	63
5.2	Aerossóis microbianos	64
5.3	Amostradores	65
5.4	Métodos para a esterilização do ar	75
5.5	Considerações finais	90
	Referências bibliográficas	90

6	CINÉTICA DE PROCESSOS FERMENTATIVOS	93
6.1	Introdução	93
6.2	Parâmetros de fermentação	95
6.3	Cálculo das velocidades	101
6.4	A curva de crescimento microbiano	103
6.5	Classificação dos processos fermentativos	107
6.6	Influência da concentração do substrato sobre a velocidade específica de crescimento	110
	Apêndice	114
	Referências bibliográficas	121
7	MODELAGEM MATEMÁTICA E SIMULAÇÃO DE PROCESSOS FERMENTATIVOS	123
7.1	Introdução	123
7.2	Formulação dos modelos matemáticos de processos fermentativos	124
7.3	Ajuste de parâmetros do modelo formulado	148
7.4	Avaliação do modelo matemático	164
7.5	Simulação de processos fermentativos	172
	Referências bibliográficas	174
8	BIORREATORES E PROCESSOS FERMENTATIVOS	179
8.1	Introdução	179
8.2	Classificação dos biorreatores	180
8.3	Formas de condução de um processo fermentativo	185
8.4	Exemplos de comparação de desempenho de biorreatores	189
	Referências bibliográficas	190
9	FERMENTAÇÃO DESCONTÍNUA	193
9.1	Fermentação descontínua	193
9.2	Inóculo	194
9.3	Mosto	196
9.4	Classificação	199
9.5	Número de dornas	200
	Referências bibliográficas	204
10	FERMENTAÇÃO DESCONTÍNUA ALIMENTADA	205
10.1	Introdução	205
10.2	Aplicações	207
10.3	Classificação	210
10.4	Modelos matemáticos	212
	Referências bibliográficas	216
11	FERMENTAÇÃO SEMICONTÍNUA	219
11.1	Definição	219
11.2	Produtividade do processo semicontínuo	220
11.3	Comentários finais	222
	Referências bibliográficas	222

12	FERMENTAÇÃO CONTÍNUA	223
12.1	Conceitos básicos	223
12.2	Vantagens e desvantagens do processo contínuo em relação ao descontínuo	224
12.3	Formas de operação no sistema contínuo	225
12.4	Formação de produtos no sistema contínuo	242
	Referências bibliográficas	245
13	FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO	247
13.1	Introdução	247
13.2	História do processo da FSS	248
13.3	Microrganismos comumente utilizados	250
13.4	Substratos: características e composição	250
13.5	Reatores para fermentação semi-sólida	254
13.6	Controles do processo	259
13.7	Vantagens e desvantagens	264
13.8	Exemplos de casos	266
	Referências bibliográficas	270
14	AGITAÇÃO E AERAÇÃO EM BIORREATORES	277
14.1	A importância da transferência de oxigênio	277
14.2	Sistemas para a transferência de oxigênio	279
14.3	Concentração de oxigênio dissolvido em soluções saturadas	281
14.4	Transferência de oxigênio e respiração microbiana	284
14.5	Transferência de oxigênio em sistemas agitados e areados	308
14.6	Considerações finais	329
	Referências bibliográficas	329
15	VARIAÇÃO DE ESCALA	333
15.1	Introdução	333
15.2	Crítérios para a ampliação de escala	336
15.3	Comparações entre critérios para a ampliação de escala	348
15.4	Redução de escala	351
15.5	Considerações finais	352
	Referências bibliográficas	353
16	REATORES COM CÉLULAS IMOBILIZADAS	355
16.1	Introdução	355
16.2	Métodos de imobilização	356
16.3	Tipos de biorreatores empregados	360
16.4	Aspectos relativos ao transporte de massa	363
16.5	Processos que utilizam células imobilizadas	366
16.6	Conclusões	370
	Referências bibliográficas	371
17	REATORES COM ENZIMAS IMOBILIZADAS	373
17.1	Introdução	373
17.2	Reatores enzimáticos	374
17.3	Exemplos de processos enzimáticos	388
	Referências bibliográficas	395

18	AUTOMAÇÃO E CONTROLE DE PROCESSOS FERMENTATIVOS	397
18.1	Introdução	397
18.2	Principais instrumentos para monitoração em linha de processos fermentativos	398
18.3	Controle aplicado a processos fermentativos	411
	Referências bibliográficas	423
19	OPERAÇÃO DE INSTALAÇÕES INDUSTRIAIS DE FERMENTAÇÃO	425
19.1	Princípios gerais para operação	425
19.2	Condições gerais para a execução de um processo fermentativo	426
19.3	Operação de uma indústria	429
19.4	Operação de um processo fermentativo asséptico	434
19.5	Exemplo de operação de indústria de fermentação	435
	Bibliografia	439
20	CONSTRUÇÃO DE EQUIPAMENTOS DE FERMENTAÇÃO	441
20.1	Introdução	441
20.2	Características básicas de reatores para cultivo de bactérias ou células animais	442
20.3	Construção do fermentador	448
20.4	Cultivo de células animais	468
20.5	Obtenção e manutenção das condições de esterilidade e biossegurança	470
20.6	Válvulas e purgadores de vapor	480
20.7	Outros tipos de reatores	485
	Bibliografia	489
21	PURIFICAÇÃO DE PRODUTOS BIOTECNOLÓGICOS	493
21.1	Introdução	493
21.2	Classificação	494
21.3	Rompimento de células microbianas	501
21.4	Precipitação	405
21.5	Ultrafiltração	507
21.6	Extração em sistemas de duas fases aquosas	507
21.7	Cromatografia	510
21.8	Tratamentos finais	514
21.9	Rotinas analíticas	515
21.10	O processo integrado de purificação	518
	Referências bibliográficas	521
22	ASPECTOS ECONÔMICOS	523
22.1	Introdução	523
22.2	Considerações sobre as diferenças variáveis e suas relações existentes em todo o estudo econômico	523
22.3	Análise de viabilidade econômica	528
22.4	Aspectos econômicos de processos fermentativos	530
22.5	Métodos de avaliação de investimento	535
	Referências bibliográficas	541

CONTEÚDO

VOLUME 3

1	PRODUÇÃO DE ETANOL	1
1.1	Importância	1
1.2	Vias de obtenção	2
1.3	Matérias-primas, composição e conservação	3
1.4	Preparação dos meios	7
1.5	Fermentação alcoólica	11
1.6	Fatores que afetam a fermentação	15
1.7	Correção dos mostos	20
1.8	Preparo do inóculo	20
1.9	Verificação prática da pureza das fermentações	23
1.10	Sistemas de fermentação	24
1.11	Fermentação alcoólica contínua	25
1.12	Salas de fermentação	28
1.13	Recipientes de fermentação	29
1.14	Destilação	29
1.15	Retificação	33
1.16	Prática da retificação industrial	34
1.17	Desidratação do etanol	36
	Bibliografia	39
2	PRODUÇÃO DE ÁCIDOS	45
2.1	Introdução	45
2.2	Ácido cítrico	45
2.3	Ácido itacônico	50
2.4	Ácido glucônico e glucono- δ -lactona	53
2.5	Ácido láctico	56
2.6	Oxogluconatos	58
	Bibliografia	58
3	PRODUÇÃO DE SOLVENTES	61
3.1	Introdução	61
3.2	Fermentação acetono-butanólica	62
3.3	Fermentação butanol-isopropanol	75
3.4	Fermentação acetona-etanol	77
	Bibliografia	78
4	PRODUÇÃO DE VITAMINAS	81
4.1	Introdução	81
4.2	Cianocobalamina	81
4.3	Riboflavina	85
4.4	Ácido ascórbico	88

4.5	Obtenção de outras vitaminas por fermentação	92
	Bibliografia	97
5	PRODUÇÃO DE ANTIBIÓTICOS	101
5.1	Introdução	101
5.2	Antibióticos β -lactâmicos	107
	Bibliografia	122
6	PRODUÇÃO DE POLISSACARÍDEOS	125
6.1	Introdução	125
6.2	Agentes de viscosidade	127
6.3	Polissacarídeos geleificantes	134
6.4	Polissacarídeos com aplicações específicas	138
6.5	Pesquisa e desenvolvimento em polissacarídeos microbianos	147
	Bibliografia	149
7	PRODUÇÃO DE AMINOÁCIDOS	155
7.1	Introdução	155
7.2	Usos comerciais dos aminoácidos	156
7.3	Métodos de produção	157
7.4	Cepas para a produção direta de aminoácidos	159
7.5	Controle do processo	162
7.6	Recuperação de produto	163
7.7	Produção de aminoácidos	164
	Bibliografia	176
8	PRODUÇÃO DE ESTERÓIDES	179
8.1	Introdução	179
8.2	O mundo das transformações	180
8.3	Transformações microbianas de esteróides e esteróis	182
8.4	Tecnologia da biotransformação	189
8.5	Modelos microbianos do metabolismo de mamíferos	195
8.6	Perspectivas futuras	196
	Bibliografia	197
9	PRODUÇÃO DE MICRORGANISMOS	199
9.1	Introdução e breve histórico	199
9.2	Princípios do crescimento microbiano	201
9.3	Produção de microrganismos e substratos usados	202
9.4	Estudo de casos de produção de microrganismos	206
9.5	Microrganismos visando outros produtos	213
	Bibliografia	214
10	PRODUÇÃO DE POLIÉSTERES BACTERIANOS	219
10.1	Introdução	219
10.2	Polihidroxialcanoatos (PHAs)	222
10.3	Metabolismo de PHAs	228
10.4	Produção de PHB e P3HB-co-3HV	238
10.5	Extração/purificação de PHB ou P3HB-co-3HV	242
10.6	Perspectivas futuras para PHAs	243
	Bibliografia	245

11	PRODUÇÃO DE BIOINSETICIDAS.	249
11.1	Introdução	249
11.2	Produção comercial	252
11.3	Processo fermentativo	253
11.4	Separação de toxinas	264
11.5	Ensaio e formulação	268
11.6	Comercialização e aplicação	269
11.7	Principais avanços e limitações	272
	Bibliografia	274
12	PRODUÇÃO DE INOCULANTES AGRÍCOLAS.	279
12.1	Introdução	279
12.2	Inoculantes para a fixação biológica de nitrogênio (FBN) em leguminosas	279
12.3	Processo de produção de inoculantes para FBN em leguminosas	280
12.4	Inoculantes micorrízicos	300
12.5	Produção e uso de inoculantes à base de fungos ectomicorrízicos	301
12.6	Considerações finais	303
	Bibliografia	303
13	PRODUÇÃO DE VACINAS.	307
13.1	Introdução	307
13.2	Histórico	307
13.3	Tipos de imunidade conferidos por vacinas	308
13.4	Principais tipos de vacinas	310
13.5	A fermentação na produção de vacinas	311
13.6	A produção de vacinas como processo unitário	313
13.7	As vacinas bacterianas — classificação e processos de produção	314
13.8	Vacinas virais	338
	Bibliografia	346
14	PRODUÇÃO DE ENZIMAS MICROBIANAS.	351
14.1	Introdução	351
14.2	Produção industrial de enzimas	354
	Bibliografia	362
15	PRODUÇÃO DE ENZIMAS INDUSTRIAIS DE ORIGEM ANIMAL.	363
15.1	Introdução	363
15.2	Pancreatina	363
15.3	Pepsina	364
15.4	Renina (coalho)	364
15.5	Catalase	365
	Bibliografia	366
16	PRODUÇÃO DE ENZIMAS INDUSTRIAIS DE ORIGEM VEGETAL.	367
16.1	Papaína	367
16.2	Produção de papaína	367
16.3	Bromelina	371
16.4	Ficina	373
16.5	Malte	374
	Bibliografia	376

17	PURIFICAÇÃO DE ENZIMAS.	377
17.1	Introdução	377
17.2	Extração	379
17.3	Purificação baseada na solubilidade	381
17.4	Purificação baseada na carga	382
17.5	Purificação baseada no tamanho	384
17.6	Purificação baseada na afinidade	386
17.7	Concentração	387
	Bibliografia	389
18	IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS.	391
18.1	Introdução	391
18.2	Métodos de imobilização	391
18.3	Tipos de suporte	393
18.4	Efeitos causados pela imobilização	394
18.5	Conclusão	402
	Bibliografia	403
19	ALGUMAS APLICAÇÕES DE ENZIMAS.	405
19.1	Introdução	405
19.2	Enzimas em medicamentos e análises clínicas	407
19.3	Enzimas em detergentes	408
19.4	Na indústria têxtil, em curtumes e na produção de antibióticos	410
19.5	Síntese enzimática de aspartame e insulina	411
19.7	Usos diversos	411
	Bibliografia	412
20	MODIFICAÇÃO DE FÉCULA POR FERMENTAÇÃO.	413
20.1	Introdução	413
20.2	Produtos fermentados a partir de matérias-primas amiláceas	414
20.3	Produtos fermentados a partir da fécula	415
20.4	A matéria-prima — a fécula	416
20.5	A tecnologia para produção da fécula fermentada	417
20.6	A produção comercial de fécula fermentada ou polvilho azedo	419
20.7	A pesquisa	426
20.8	A comercialização do polvilho azedo no Brasil	434
20.9	A caracterização e a qualidade do polvilho azedo	435
20.10	Os produtos de polvilho azedo no Brasil e na América Latina	444
20.11	Novos produtos	452
20.12	O mercado de polvilho azedo no Brasil e na América Latina	457
	Bibliografia	460
21	APLICAÇÕES DA BIOTECNOLOGIA NA PRODUÇÃO DE PAPEL E CELULOSE.	465
21.1	Introdução	465
21.2	Madeira — composição química e ultra-estrutura	466
21.3	Biodegradação da madeira e seus componentes	468
21.4	Processamento da madeira na indústria de papel e celulose	471
21.5	Aplicações da biotecnologia na indústria papeleira	473
	Bibliografia	483

22	LIXIVIAÇÃO BACTERIANA DE MINÉRIOS	485
22.1	Introdução	485
22.2	As bactérias do processo	488
22.3	Os minerais lixiviáveis	493
22.4	Desenvolvimento experimental da lixiviação bacteriana	504
22.5	A bioidrometalúrgica no Brasil	508
	Bibliografia	510
23	TRATAMENTO BIOLÓGICO DE EFLUENTES	513
23.1	Introdução	513
23.2	Abordagem dos problemas de resíduos industriais	514
23.3	Processos biológicos de tratamento de resíduos	518
23.4	Tratamento biológico aeróbio	521
23.5	Tratamento biológico anaeróbio	536
23.6	Lagoas	542
	Bibliografia	546
24	PROCESSOS COM CÉLULAS ANIMAIS	547
24.1	Introdução	547
24.2	As células	548
24.3	Condições básicas de cultivo	552
24.4	Catabolismo celular	556
24.5	Biorreatores	560
24.6	Produtos	570
	Bibliografia	579
25	CONTROLE DE CONTAMINAÇÕES MICROBIANAS EM PROCESSOS FERMENTATIVOS	583
25.1	Introdução	583
25.2	Desinfetantes químicos	585
25.3	Antibióticos	587
	Bibliografia	593
26	TECNOLOGIA DA SIDRA	597
26.1	Definições de sidra	597
26.2	Maças para sidra	598
26.3	Fermentação	600
26.4	Tecnologia	602
26.5	Fermentação alcoólica	603
26.6	Estabilização e maturação	605
26.7	Clarificação	606
26.8	Filtração	607
26.9	Alterações na sidra	608
26.10	Características físicas e químicas do produto final	608
	Bibliografia	610

CONTEÚDO

VOLUME 4

1	GENERALIDADES SOBRE BEBIDAS ALCOÓLICAS	1
1.1	Introdução	1
1.2	Legislação brasileira	2
1.3	Cervejas	4
1.4	Vinhos	8
1.5	Bebidas por mistura	12
1.6	Bebidas destiladas	14
1.7	Bebidas álcool-ácidas	18
	Bibliografia	19
2	TECNOLOGIA DO VINHO	21
2.1	Definições de vinho e de enologia	21
2.2	Composição do vinho	22
2.3	Uvas para vinho	30
2.4	Composição física e química da uva madura	31
2.5	Vindima	34
2.6	Correções do mosto	35
2.7	Microbiologia do vinho	39
2.8	Fermentações	43
2.9	Vinificação	47
2.10	Clarificação de vinho	60
2.11	Conservação	63
2.12	Envelhecimento de vinhos	63
2.13	Alterações no vinho	65
	Bibliografia	67
3	TECNOLOGIA DA SIDRA	69
3.1	Definições de sidra	69
3.2	Maçãs para sidra	69
3.3	Fermentação	74
3.4	Tecnologia	76
3.5	Fermentação alcoólica	83
3.6	Estabilização e estocagem	84
3.7	Clarificação	85
3.8	Filtração	86
3.9	Alterações na sidra	86
3.10	Características físicas e químicas do produto final — sidra	88
	Bibliografia	90

4	CERVEJA	91
4.1	Introdução	91
4.2	Legislação brasileira	93
4.3	Matérias-primas	97
4.4	Leveduras e bactérias	107
4.5	Processamento	112
4.6	Qualidade da cerveja	130
4.7	Tipos de cerveja	138
	Bibliografia	143
5	AGUARDENTES	145
5.1	Introdução	145
5.2	Classificação das bebidas alcoólicas e das aguardentes	146
5.3	Definição	147
5.4	Bebidas fermento-destilladas e destilo-retificadas	147
5.5	Aguardente de cana-de-açúcar	163
5.6	Outras aguardentes	179
5.7	Padrões de identidade	179
	Bibliografia	180
6	VINAGRES	183
6.1	Introdução e histórico	183
6.2	Padronização e legislação	184
6.3	Terminologia vinagreira	186
6.4	Matérias-primas	187
6.5	Microrganismos	188
6.6	Rendimento e produtividade	190
6.7	Fatores que afetam a qualidade do vinagre	191
6.8	Bioquímica da fermentação acética	191
6.9	Processos de fabricação	193
6.10	Comparação entre processos	200
6.11	Tipos de vinagres	200
6.12	Tratamento final	201
6.13	Envelhecimento	202
6.14	Materiais resistentes ao ácido acético	202
6.15	Alterações e defeitos	203
6.16	Usos e aplicações	204
6.17	Resumo	206
	Bibliografia	207
7	LEITES FERMENTADOS	209
7.1	Legislação	209
7.2	Características de leites fermentados	212
7.3	Tecnologia de produção de alguns leites fermentados	212
	Bibliografia	223
8	QUEIJOS	225
8.1	Introdução	225
8.2	Composição e valor nutricional	226
8.3	Classificação	226
8.4	Matéria-prima e ingredientes	228

8.5	Processo de fabricação de queijos	234
8.6	Os diferentes tipos de queijo	245
8.7	Ultrafiltração no processo de fabricação de queijos	247
	Bibliografia	251
9	MANTEIGAS	255
9.1	Legislação	255
9.2	Fabricação	257
9.3	Etapas do processo descontínuo de produção	257
9.4	Processo contínuo de produção	264
9.5	Embalagem	264
9.6	Armazenamento	265
9.7	Rendimento manteigueiro	265
9.8	Defeitos da manteiga	266
9.10	Manteiga de garrafa	266
	Bibliografia	267
10	FERMENTAÇÃO LÁTICA DE HORTALIÇAS E AZEITONAS	269
10.1	Introdução	269
10.2	Produtos fermentados	270
10.3	Microbiologia da fermentação	272
10.4	O processo de fermentação láctica	277
10.5	Azeitonas	293
	Bibliografia	302
11	PESCADO FERMENTADO	305
11.1	Introdução	305
11.2	Pescado como matéria-prima	306
11.3	Processo de fermentação do pescado	311
	Bibliografia	337
12	CACAU	347
12.1	Introdução	347
12.2	Estudo empírico para a obtenção do cacau comercial	348
12.3	Estudo químico e microbiológico da obtenção do cacau comercial	351
12.4	Características ideais das amêndoas de cacau após o processamento	356
12.5	Classificação do cacau (determinação de qualidade)	358
12.6	Composição química do cacau	360
12.7	Manufatura	361
	Bibliografia	363
13	PÃO	365
13.1	Histórico	365
13.2	Moagem do trigo	366
13.3	Potencial de panificação da farinha de trigo	367
13.4	Características e funções dos ingredientes	368
13.5	Processamento do pão	381
	Bibliografia	386

14	APLICAÇÕES DE ENZIMAS NA TECNOLOGIA DE ALIMENTOS	387
14.1	Introdução	387
14.2	Uso de enzimas em panificação	388
14.3	Uso de enzimas na modificação do amido	393
14.4	Uso de enzimas na indústria de sucos de frutas	398
14.5	Uso de enzimas na modificação de proteínas	403
14.6	Uso de enzimas na indústria de laticínios	405
14.7	Uso de enzimas em bebidas alcoólicas	409
14.8	Aplicações diversas de enzimas	414
	Bibliografia	418
15	PROTEÍNAS DE ORIGEM MICROBIANA	421
15.1	Introdução	421
15.2	Bactérias	422
15.3	Fungos	422
15.4	Leveduras	422
15.5	Matérias-primas	425
15.6	Leveduras secas de destilarias de álcool	425
15.7	Fabricação de leveduras secas de destilarias de álcool	430
15.8	Biomassa algal	439
	Bibliografia	443
16	PRODUÇÃO DE LIPÍDEOS POR MICRORGANISMOS	447
16.1	Introdução	447
16.2	Bactérias, fungos e leveduras	449
16.3	Matérias-primas	453
16.4	Substratos	453
16.5	Nutrientes	455
16.6	Separação dos lipídeos	456
16.7	Algas	457
16.8	Extração da gordura	461
	Bibliografia	463
17	ALIMENTOS ORIENTAIS	465
17.1	Introdução	465
17.2	História das fermentações dos alimentos	466
17.3	Microbiologia e bioquímica	466
17.4	Valores nutritivos	467
17.5	Classificação dos alimentos fermentados	468
17.6	Missô	469
17.7	Molho de soja (Shoyu)	476
17.8	Natô	485
	Bibliografia	488
18	CONSERVAÇÃO DE FORRAGENS: SILAGEM	491
18.1	Introdução	491
18.2	Tecnologia da ensilagem	492
18.3	Bioquímica da silagem	493

18.4	Microbiologia da silagem	495
18.5	Silagem pré-secada	499
18.6	Produção de silagem de grãos	500
18.7	Aditivos na silagem	501
18.8	Problemas comuns na ensilagem e causas prováveis	503
18.9	Metas para produção de uma silagem estável	503
	Bibliografia	504
19	CHÁ	507
19.1	Introdução	507
19.2	Cultivo, produção e consumo	507
19.3	Composição	510
19.4	Beneficiamento do chá	513
19.5	Qualidade do chá	517
19.7	Nomenclatura	518
19.7	Classificação	518
19.8	Outros processamentos	519
19.9	Sucedâneos do chá	521
	Bibliografia	522

1.1 – Introdução à Microbiologia

A partir da descoberta e cultivo de células de organismos vivos, ficou claro que a divisão dos seres vivos em plantas e animais não era suficiente. O zoólogo E.H. Haeckel, em 1858, propôs a criação de um terceiro reino, denominado Protista, englobando as algas, fungos e protozoários. Essa classificação mostra a importância que se dá aos estudos sobre ultra-estrutura celular e metabolismo das células vivas, as procarióticas e as eucarióticas. Nos últimos 100 anos, tem sido limitado por membrana nuclear e apresenta mesmo a organização celular eucariótica. Em 1969, R.H. Wittaker propôs a expansão da classificação proposta por Haeckel, baseado não só na organização celular, mas também na forma de obter energia e alimentos. Reino Plantae (algas e plantas), Reino Fungi (fungos), Protista (microalgas e protozoários) e Reino Monera (bactérias e cianobactérias) (Fig. 1.1).

Estudando as similaridades e diferenças de DNA ribossômico, C. Woese e colegas, em 1979, uma nova classificação para os organismos. Denominou o primeiro Reino Arqueobactérias (incluindo bactérias metanogênicas, bactérias termófilas, bactérias acidófilas e bactérias halófilas), Denominou o Supra-reino Eubactéria (incluindo as demais bactérias e cianobactérias) e Denominou o Supra-reino Eucarioto (incluindo plantas, animais, fungos, protozoários e algas) (Fig. 1.2).

1

ELEMENTOS
DE MICROBIOLOGIA

Flávio Alterthumm

1.1 – Introdução à Microbiologia

A partir da descoberta e início dos estudos dos microrganismos, ficou claro que a divisão dos seres vivos em dois reinos, animais e plantas, era insuficiente. O zoólogo E.H. Haeckel, em 1866, sugeriu a criação de um terceiro reino, denominado Protista, englobando as bactérias, algas, fungos e protozoários. Essa classificação mostrou-se satisfatória até que estudos mais avançados sobre ultra-estrutura celular demonstraram duas categorias de células: as procarióticas e as eucarióticas. Nas eucarióticas o núcleo é limitado pela membrana nuclear e apresenta no seu interior vários cromossomos. Assim, em 1969, R.H. Wittaker propôs a expansão da classificação proposta por Haeckel, baseado não só na organização celular mas também na forma de obter energia e alimento: Reino Plantae, Reino Animalia, Reino Fungi, Reino Protista (microalgas e protozoários) e Reino Monera (bactérias e cianobactérias) (Fig. 1.1).

Estudando as similaridades e diferenças do RNA ribossômico, C. Woese propôs, em 1979, uma nova classificação para os seres vivos: Domínio ou Supra-reino Arquibactérias (incluindo bactérias metanogênicas, bactérias termófilas, bactérias acidófilas e bactérias halófilas), Domínio ou Supra-reino Eubactéria (incluindo as demais bactérias e cianobactérias) e Domínio ou Supra-reino Eucarioto (incluindo plantas, animais, fungos, protozoários e algas) (Fig. 1.2).

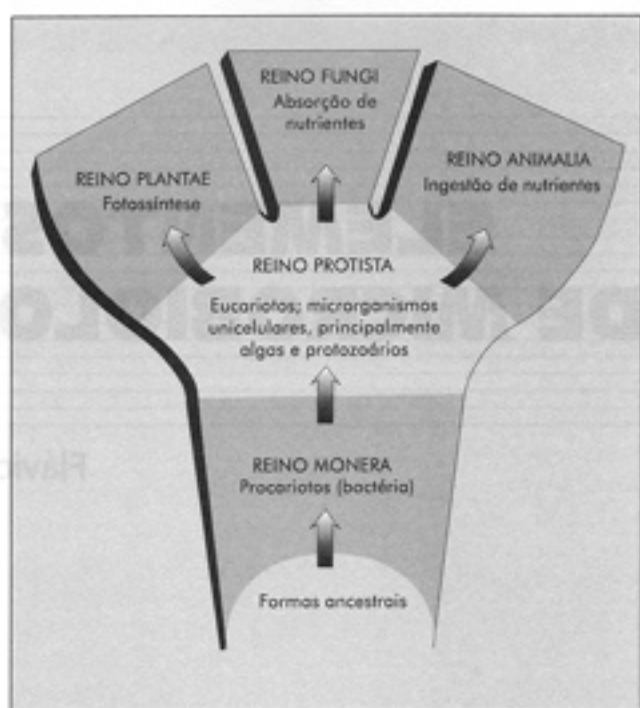


Figura 1.1 – Distribuição dos organismos vivos em reinos, de acordo com a proposta de Whittaker. (Figura adaptada do livro *Microbiology, Concepts and Applications* de Michael J. Pelczar Jr., E.C.S. Chan e Noel R. Krieg, 1993.)

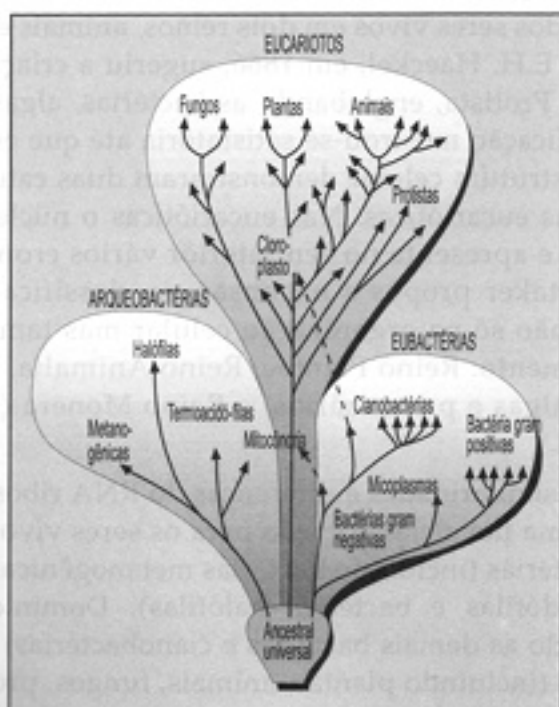


Figura 1.2 – Distribuição dos organismos em Domínios ou Supra-reinos, de acordo com a proposta de Carl R. Woese.

Por não apresentarem uma estrutura celular, os vírus não são considerados seres vivos e portanto não se enquadram nas classificações acima. São formados basicamente por uma porção de material genético, DNA ou RNA, nunca os dois simultaneamente, envolvidos por proteína. Alguns vírus, com estrutura mais complexa, têm sobreposto à camada protéica um envoltório lipoprotéico. Os vírus, quando fora das células, não possuem atividade metabólica própria e portanto não sintetizam protoplasma nem crescem. São sintetizados pelas células hospedeiras, nas quais penetram, pois assumem o comando do metabolismo. O aumento do número de vírus não ocorre pelo processo de divisão como nos organismos celulares, mas sim feito pela replicação viral.

Tabela 1.1 – Diferenças na organização e estrutura de células procarióticas e eucarióticas

CARACTERÍSTICA	PROCARIÓTICAS	EUCARIÓTICAS
Membrana nuclear	Ausente	Presente
Nucléolo	Ausente	Presente
Número de cromossomas	Um	Mais que um
Reticulo endoplasmático	Ausente	Presente
Aparelho de Golgi	Ausente	Presente
Mitocôndria	Ausente	Presente
Lisossomas	Ausente	Presente
Histonas associadas ao cromossoma	Ausente*	Presente
Ribossomas	70S	80S
Cloroplastos	Ausente	Presente em plantas
Parede celular com mucocomplexo	Presente*	Ausente
Transporte de elétrons	Membrana	Mitocôndrias
Fagocitose	Ausente	Às vezes presente
Pinocitose	Ausente	Às vezes presente

* Há exceções

Os vírus são classificados de acordo com o ácido nucléico, composição química e morfologia. Embora sejam objetos de estudo da microbiologia, não serão abordados neste capítulo introdutório.

O sistema formal de organização, classificação e nomenclatura dos seres vivos é chamado de taxonomia. A organização está baseada em sete níveis descendentes, sendo o reino o mais amplo e maior, e a espécie o mais específico e menor. Os demais níveis são, em ordem decrescente: divisão, classe, ordem, família e gênero.

A classificação é o arranjo dos organismos em grupos, de preferência obedecendo às relações evolutivas. A nomenclatura é o processo de dar nomes às espécies existentes. É binominal, sendo o nome científico uma combinação do nome genérico (gênero) seguido da espécie. O nome do gênero é iniciado com letra maiúscula, mas o da espécie não, e ambos os nomes são escritos em itálico ou grifado. Exemplos:

Saccharomyces cerevisiae
gênero espécie

Escherichia coli
gênero espécie

Saccharomyces cerevisiae
gênero espécie

Escherichia coli
gênero espécie

O microscópio foi e ainda é, em muitos casos, o equipamento laboratorial mais utilizado no estudo dos microrganismos. Há duas categorias principais de microscópios empregados: óptico e eletrônico. Eles diferem na forma pela qual se dá a ampliação e visualização do objeto. Na microscopia óptica um sistema de lentes manipula um feixe de luz que atravessa o objeto e chega ao olho do observador; na microscopia eletrônica a luz é substituída por um feixe de elétrons, e as lentes por um sistema de campo magnético. A microscopia óptica comum aumenta até 2.000 vezes e tem variações como a microscopia de fase, de campo escuro e de fluorescência. A microscopia eletrônica permite um aumento de cerca de 400.000 vezes e apresenta variações como a de transmissão e a de varredura.

A Fig. 1.3 apresenta alguns exemplos comparativos de tamanho de microrganismos, vírus e a tabela de equivalência das unidades empregadas na microbiologia.

Neste capítulo abordaremos somente aspectos gerais relativos a bactérias e fungos.

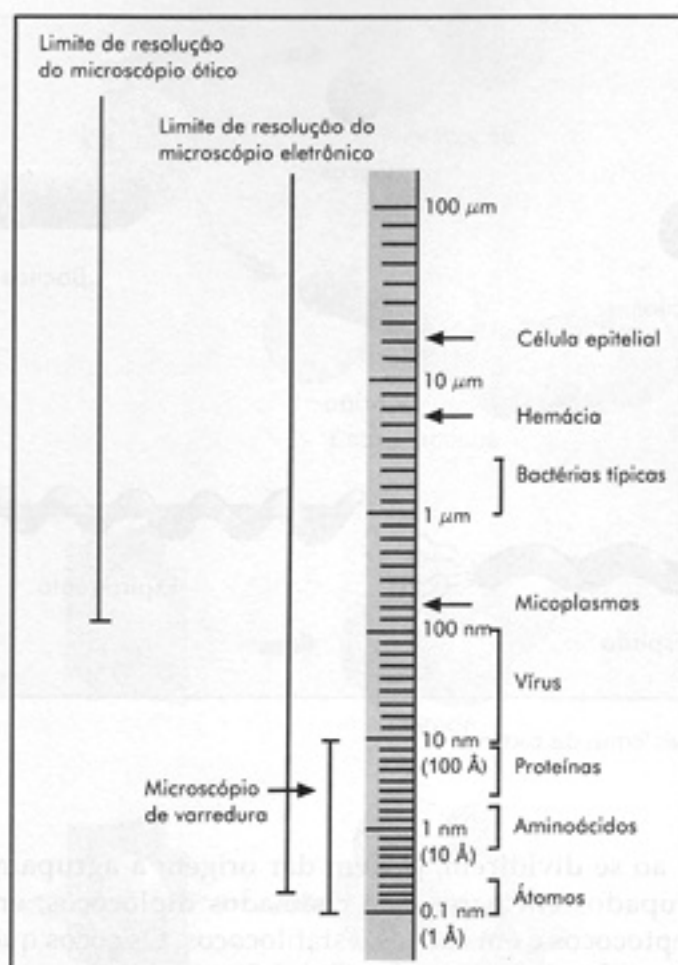


Figura 1.3 – Limites de resolução dos microscópios e possibilidades de visualização de células, bactérias, vírus, moléculas e átomos.

1.2 – Morfologia e estrutura

1.2.1 – Bactérias

Quando observadas ao microscópio, a maior parte das bactérias apresenta-se em uma das três formas: esféricas, cilíndricas ou espiraladas. As bactérias de forma esférica denominam-se cocos e as cilíndricas, bacilos. Nas espiraladas, quando o corpo é rígido e apresenta várias espirais, recebem o nome de espirilos e quando o corpo é rígido, porém em forma de vírgula ou meia espiral, recebem a designação de vibriões (Fig. 1.4).

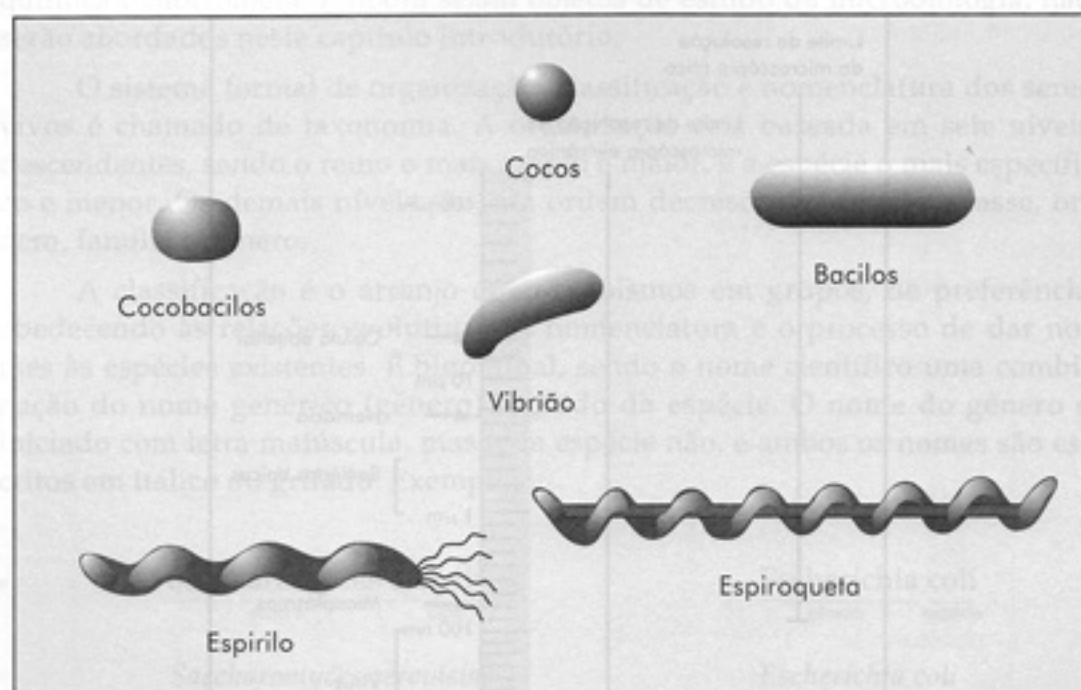


Figura 1.4 – Principais formas das bactérias.

Os cocos, ao se dividirem, podem dar origem a agrupamentos característicos. Se agrupados em pares, são chamados diplococos; em cadeias, são chamados estreptococos e em cachos, estafilococos. Os cocos que permanecem isolados são chamados de micrococos (Fig. 1.5).

Os bacilos que ao se dividirem permanecem em cadeias são chamados de estreptobacilos.

A morfologia individual e os agrupamentos podem ser melhor observados quando as bactérias apresentam-se coradas. O método mais usual de coloração é o de Gram, que permite a divisão em dois grandes grupos: gram-positivas e gram-negativas.

Caracteristicamente, as células bacterianas são pequenas. O diâmetro das esféricas varia de 0,5 a 4,0 μm , enquanto que o comprimento das cilíndricas raramente ultrapassa 19,0 μm . Recentemente foi descoberta uma bactéria macroscópica (0,5 μm de comprimento) habitando o interior de peixes que vivem a centenas de metros de profundidade nos oceanos.

Quanto à estrutura, a célula bacteriana apresenta as características dos seres procarióticos (Fig. 1.6).

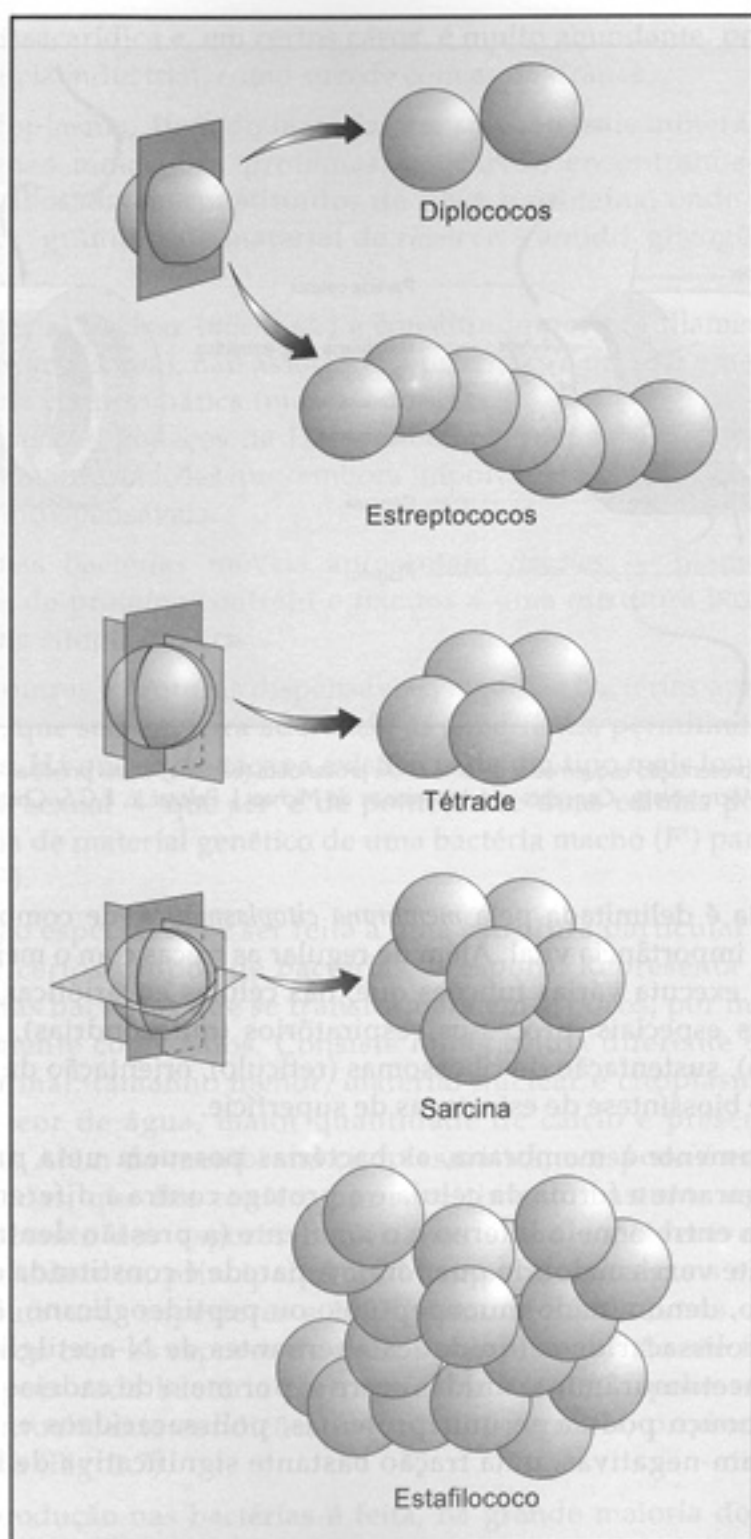


Figura 1.5 – Arranjos dos cocos em função do plano de divisão.

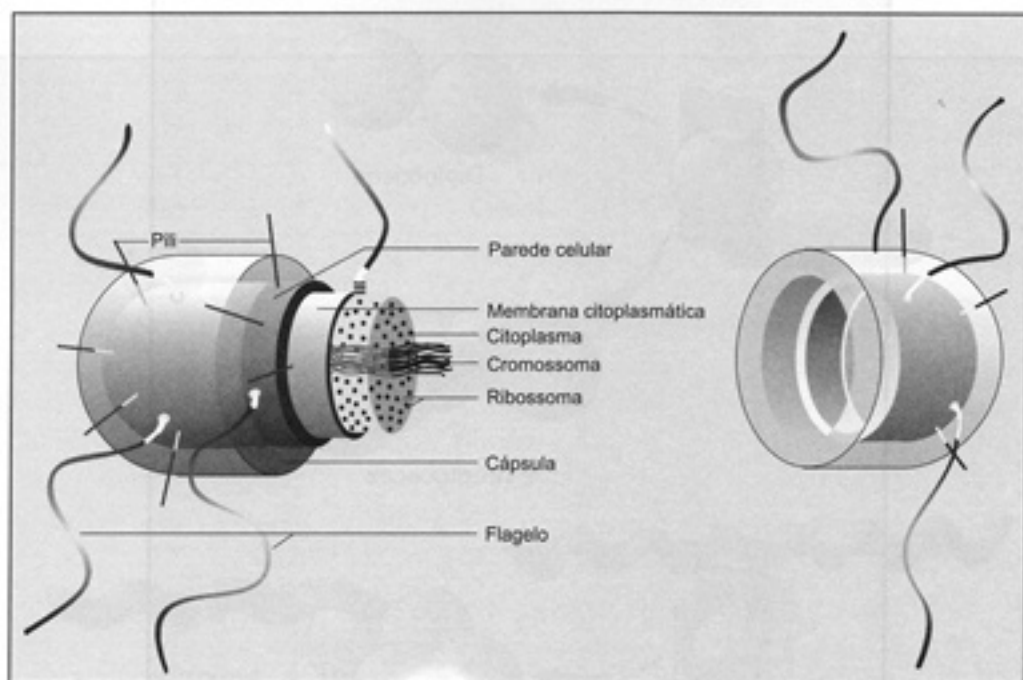


Figura 1.6 – Representação esquemática de uma célula procariótica (bactéria) e suas principais estruturas (Figura adaptada do livro *Microbiology. Concepts and Applications* de Michael J. Pelczar Jr., E.C.S. Chan e Noel R. Krieg, 1993).

A célula é delimitada pela *membrana citoplasmática*, de composição lipoprotéica e de importância vital. Além de regular as trocas com o meio ambiente, a membrana executa várias funções que, nas células eucarióticas, dependem de estruturas especiais: processos respiratórios (mitocôndrias), fotossíntese (cloroplastos), sustentação de ribossomas (retículo), orientação da divisão nuclear (fuso) e biossíntese de estruturas de superfície.

Externamente à membrana, as bactérias possuem uma *parede celular* rígida, que garante a forma da célula e a protege contra a diferença de pressão osmótica entre o meio interno e o ambiente (a pressão dentro da célula pode ser vinte vezes maior do que fora). A parede é constituída de um arcabouço básico, denominado mucopeptídeo ou peptideoglicano, formado de cadeias de polissacarídeos (unidades alternantes de N-acetilglicosamina e de ácido N-acetilmurâmico) unidas entre si por meio de cadeias peptídicas. A esse arcabouço podem se unir proteínas, polissacarídeos e, no caso de bactérias gram-negativas, uma fração bastante significativa de lipopolissacarídeos.

Algumas bactérias apresentam externamente à parede uma camada mucoosa que, quando definida, é chamada de *cápsula*. Esta tem natureza polipeptí-

dica ou polissacarídica e, em certos casos, é muito abundante, podendo então ter importância industrial, como sucede com as dextranas.

No citoplasma, além do material em solução (sais minerais, aminoácidos, pequenas moléculas, proteínas, açúcares), encontram-se partículas, tais como: ribossomos, constituídos de RNA e proteína, onde ocorre a síntese protéica; grânulos de material de reserva – amido, glicogênio, lipídeos ou fosfatos.

O material nuclear (*nucleóide*) é constituído por um filamento duplo de DNA (um cromossoma), não associado a proteínas e preso a uma invaginação da membrana citoplasmática (mesossoma). Ainda no citoplasma podemos encontrar *plasmídeos*, pedaços de DNA circulares menores que o cromossoma. Eles codificam informações que, embora importantes para a célula, não são essenciais ou indispensáveis.

Algumas bactérias móveis apresentam *flagelos* — filamentos longos constituídos de proteína contrátil e fixados a uma estrutura basal localizada na membrana citoplasmática.

Entre outras estruturas dispensáveis, algumas bactérias apresentam *fímbrias* ou *pili*, que servem para aderência às superfícies, permitindo a formação de biofilmes. Há que se destacar a existência de um tipo mais longo de fímbria — a fímbria sexual — que serve de ponte entre duas células por ocasião da transferência de material genético de uma bactéria macho (F') para uma bactéria fêmea (F).

Menção especial deve ser feita a uma estrutura particular apresentada apenas por certos grupos de bactérias, o esporo. Representa uma fase na vida de certas bactérias que se transformam em esporos, por motivos ainda imperfeitamente conhecidos. Consiste numa célula diferente da forma vegetativa normal: tamanho menor, material nuclear e citoplasma condensados, baixo teor de água, maior quantidade de cálcio e presença de ácido dipicolínico. Além da membrana citoplasmática, o esporo é envolvido por várias camadas, que lhe confere um revestimento bastante espesso. O aspecto importante dos esporos bacterianos é sua considerável resistência aos agentes externos, principalmente à temperatura; alguns esporos resistem a temperaturas superiores a 100°C durante várias horas. Ao contrário do que sucede com os esporos de outros organismos, não são formas de reprodução, pois cada bactéria se transforma em um esporo e este, encontrando eventualmente condições favoráveis, germina, produzindo apenas uma bactéria (Fig. 1.7).

A reprodução nas bactérias é feita, na grande maioria dos casos, pelo processo da divisão binária simples, na qual uma célula, atingindo um determinado tamanho, divide-se ao meio, dando duas células-filhas iguais.

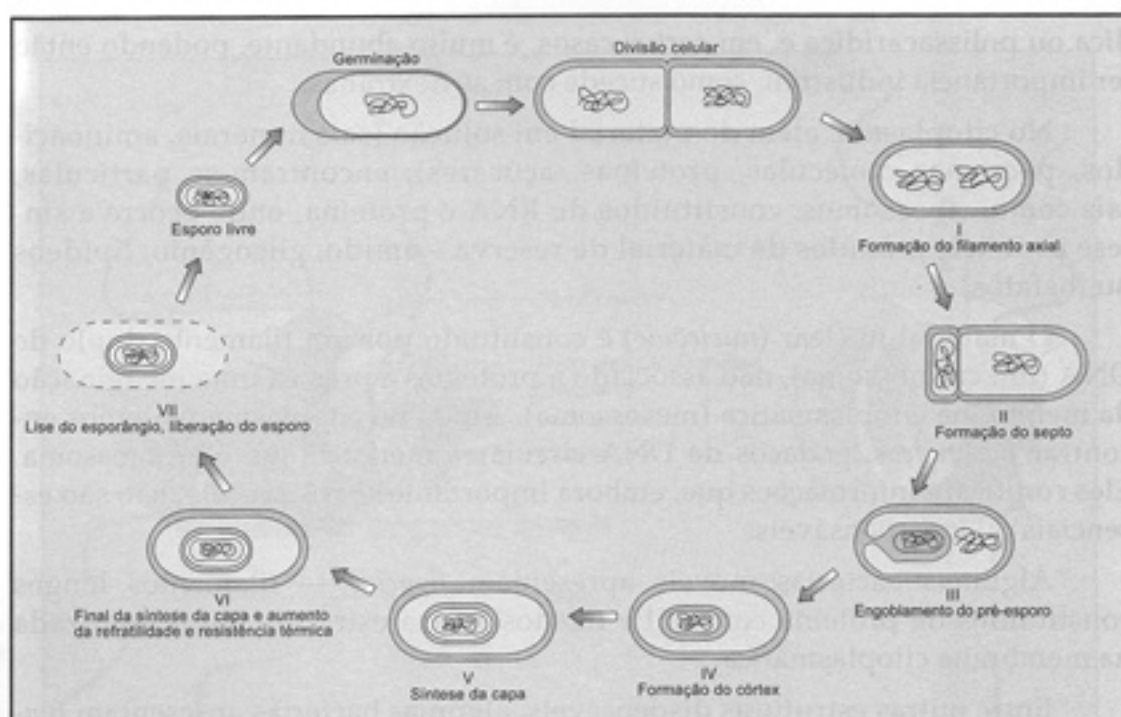


Figura 1.7 – Esquema de formação do endósporo bacteriano.

1.2.2 – Fungos

Os fungos são seres eucarióticos, heterotróficos, que não sintetizam clorofila, portanto não fazem fotossíntese, não armazenam amido como material de reserva e sim glicogênio e não têm celulose na parede celular, com exceção de alguns fungos aquáticos. São ubíquos, podendo ser encontrados no ar, solo, água, vegetais e animais.

Do ponto de vista morfológico, é conveniente distingui-los em *leveduras* e *bolores*. Essa distinção não tem valor taxonômico, pois ambas as formas podem ser encontradas num mesmo grupo de fungos.

As leveduras são geralmente unicelulares, de forma esférica, elíptica ou filamentosa. O tamanho varia de 1 a 5 μm de diâmetro a 5-30 μm de comprimento.

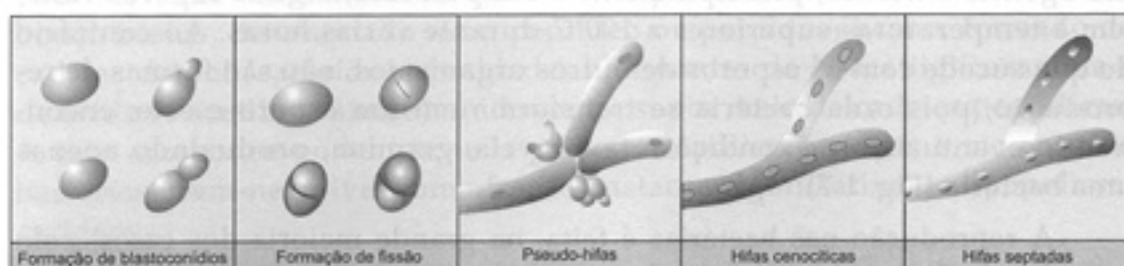


Figura 1.8 – Formas de apresentação das leveduras (esquerda) e bolores (direita).

Os bolores são constituídos por células multinucleadas (cenócitos), que formam tubos chamados *hifas*; ao conjunto de hifas dá-se o nome de *micélio*. As hifas podem ser contínuas ou septadas (Fig. 1.8).

A célula fúngica (leveduras e bolores), tem *membrana citoplasmática* lipoprotéica, cuja função principal é regular as trocas com o meio ambiente. Possui uma *parede celular* rígida, que confere resistência às pressões osmóticas e mecânicas. Sua natureza é polissacarídica em maior proporção, contendo também proteínas e lipídeos. No *citoplasma* encontram-se, além dos componentes usuais em solução, vacúolos, mitocôndrias, retículo endoplasmático, ribossomos, material de reserva (gorduras e carboidratos). O *núcleo*, tipicamente eucariótico, contém nucléolo, vários cromossomas e histonas envolvidos por uma membrana nuclear (Fig. 1.9).

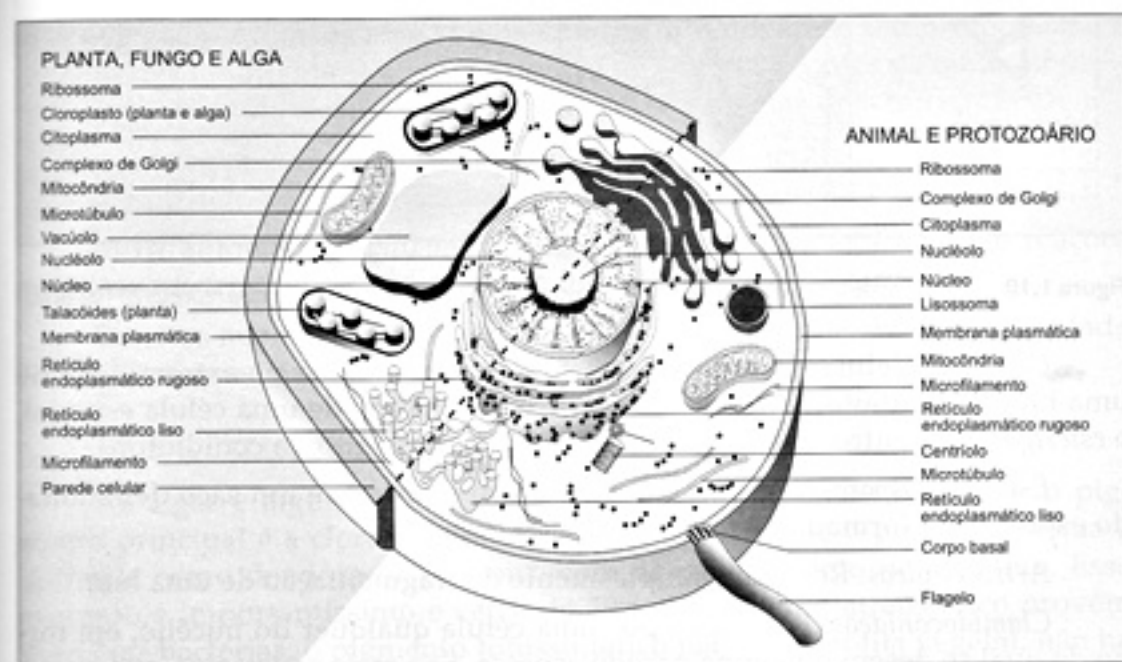


Figura 1.9 – Representação esquemática da célula eucariótica e suas principais estruturas (Figura adaptada do livro *Microbiology. An introduction* de Gerard J. Tortora, Berdell R. Funke e Christine L. Case, 1995).

Os fungos aquáticos apresentam *flagelos* para sua locomoção e poucos fungos possuem *cápsula*.

Os *esporos* fúngicos têm uma importância toda especial, pois além de serem a forma mais freqüente de reprodução, são os principais veículos de disseminação. Os esporos podem ter origem assexuada ou sexuada. A maneira pela qual se formam e se dispõem, constitui elemento importante na identificação, particularmente nos bolores. Os tipos fundamentais podem ser visualizados na Fig. 1.10.

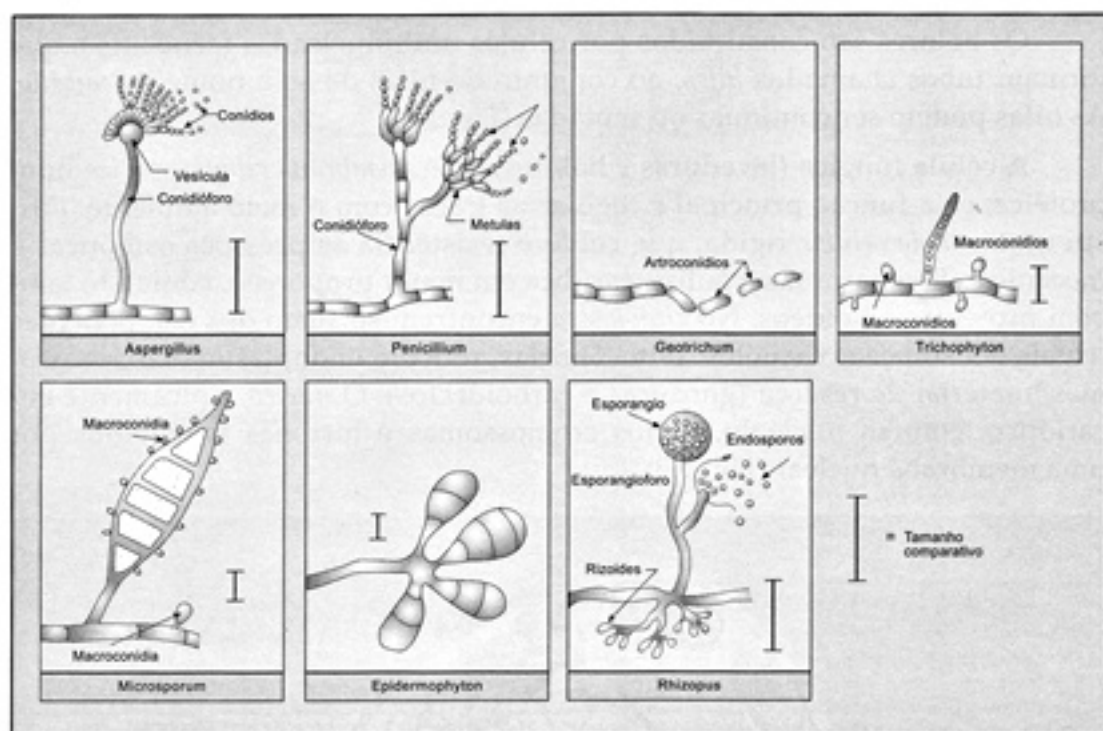


Figura 1.10 – Exemplos de formação e localização dos esporos fúngicos. A barra comparativa representa 100 μm .

Conídeos. Células isoladas ou em cadeias, localizadas na extremidade de uma hifa, o conidióforo, frequentemente se originando de uma célula especial, o *sterigma*; em outros casos, originam-se por brotamento do conidióforo.

Esporangiosporos. Esporos localizados no interior de um saco denominado esporângio, formado na extremidade de uma hifa.

Artroconídeos. Resultam simplesmente da fragmentação de uma hifa.

Clamidoconídeos. Formados por uma célula qualquer do micélio, em torno da qual se desenvolve uma parede espessa. São mais resistentes que os outros tipos de esporos.

Na reprodução sexuada, os esporos são formados pela união de duas células e fusão de seus núcleos seguida de divisão, o que produz um número variável de células. Há, também, vários tipos conforme segue.

Ascosporos. Os esporos formados, em número de oito, ficam contidos no interior de um saco, ou asco, formado pela parede resultante da fusão das duas células iniciais.

Oosporos. Formados pela fusão de uma célula masculina pequena com uma célula feminina grande.

Basidiosporos. Esporos formados na extremidade de células especiais chamadas basídios. Caracterizam os cogumelos.

Zigosporos. Conseqüentes da fusão de duas células idênticas.

Semelhante aos bolores, as leveduras podem se reproduzir assexuada ou sexuadamente. No primeiro caso, o processo mais comum é o brotamento, do qual resultam células-filhas inicialmente menores que a célula-mãe. Algumas leveduras reproduzem-se por divisão binária, como as bactérias.

A reprodução sexuada se faz pela formação de *ascosporos*, isto é, esporos contidos no interior de um asco.

1.3 – Nutrição microbiana

1.3.1 – Considerações gerais

Basicamente as necessidades nutritivas dos microrganismos são as mesmas que as de todos os seres vivos, que, para renovarem seu protoplasma e exercerem suas atividades, exigem fontes de energia e fontes de material plástico. Nos seres superiores, todavia, encontramos apenas dois tipos nutritivos:

a) os vegetais são *fotossintéticos*, isto é, obtêm energia da luz solar, e *autotróficos*, nutrindo-se exclusivamente de substâncias inorgânicas;

b) os animais são *quimiotróficos*, obtendo energia às custas de reações químicas e *heterotróficos*, por exigirem fontes orgânicas de carbono.

Entre os microrganismos, principalmente as bactérias, há uma variedade de tipos intermediários entre os dois tipos mencionados.

1.3.2 – Fontes de energia

As algas e algumas bactérias são *fotossintéticas*. Nas primeiras o pigmento principal é a clorofila, como nas plantas; durante o processo a água é utilizada como doadora de elétrons, com desprendimento de oxigênio. Esse processo é importantíssimo e cerca de 50% do oxigênio atmosférico provém dele. Nas bactérias, o pigmento fotossintético não é a clorofila vegetal; não há produção de oxigênio, pois a água não é utilizada como fonte de elétrons. Bactérias que utilizam compostos inorgânicos (H_2S , por exemplo) para esse fim são chamadas de *litotróficas*; as *organotróficas* são as que exigem doadores orgânicos de elétrons.

Os fungos e a grande maioria das bactérias são *quimiotróficos*, obtendo energia às custas de reações químicas, onde substratos adequados são oxidados. Os microrganismos litotróficos oxidam compostos inorgânicos, enquanto que os organotróficos oxidam compostos orgânicos. No primeiro grupo encontramos somente bactérias, algumas de considerável importância. Como exemplo, as bactérias do gênero *Thiobacillus* são capazes de oxidar enxofre produzindo ácido sulfúrico. São, por isso, utilizadas na lixiviação de metais ou minérios pobres, como de cobre ou de urânio, onde o processo químico

usual seria pouco econômico. No segundo grupo encontramos os fungos, além de um grande número de bactérias.

1.3.3 – Fontes de material plástico

Para a renovação da matéria viva, os elementos quantitativamente mais importantes são o carbono, o hidrogênio, o oxigênio, o nitrogênio, o enxofre e o fósforo.

Fontes de carbono. Para os microrganismos *autotróficos* a única fonte de carbono é o CO_2 ou o íon bicarbonato, a partir dos quais conseguem sintetizar todos os compostos orgânicos de que necessitam. Fungos e a maioria das bactérias são *heterotróficos*, exigindo fontes orgânicas de carbono; destas, as mais comuns são os carboidratos, particularmente D-glicose; aminoácidos, ácidos monocarboxílicos, lipídeos, álcoois e mesmo polímeros como amido e celulose podem também ser utilizados. Na realidade, qualquer composto orgânico natural e muitos sintéticos podem ser utilizados por algum microrganismo. Essa versatilidade é de uma extraordinária importância, permitindo o emprego de microrganismos numa extensa série de transformações úteis para o homem. Na maior parte das vezes, o mesmo composto é usado para obter energia e esqueletos de carbono. Além disso, os microrganismos heterotróficos são também capazes de fixar CO_2 (muitos o exigem em quantidades maiores), embora não como fonte única de carbono. Os elementos químicos oxigênio e hidrogênio geralmente fazem parte dos compostos orgânicos.

Fontes de nitrogênio. Quanto à necessidade de nitrogênio há, em linhas gerais, três categorias de microrganismos. Algumas bactérias retiram o nitrogênio diretamente da atmosfera e o convertem a nitrogênio orgânico. Essa “fixação” de nitrogênio é exercida por bactérias dos gêneros *Azotobacter*, *Clostridium* e *Rhizobium*. Elas executam o processo em simbiose com plantas leguminosas. Estudos recentes têm demonstrado que, além desses, outros microrganismos são capazes de fixar diretamente o nitrogênio atmosférico: algumas algas azul esverdeadas e bactérias dos gêneros *Achromobacter*, *Nocardia*, *Pseudomonas* e *Aerobacter*. Novamente temos aqui um processo de considerável importância econômica. Tais microrganismos podem contribuir de maneira significativa na fertilidade e produtividade do solo. Numerosos fungos, algas e a quase totalidade das bactérias utilizam compostos inorgânicos de nitrogênio, em especial sais de amônio e ocasionalmente nitratos (raramente nitritos). Fungos e algumas bactérias exigem fontes orgânicas de nitrogênio, representadas por um número variável de aminoácidos. De um modo geral, a adição de aminoácidos ou hidrolisados de proteínas favorece o crescimento da maioria dos microrganismos heterotróficos.

Íons inorgânicos essenciais. Além de carbono e nitrogênio, os microrganismos exigem uma série de outros elementos, sob a forma de compostos inorgâ-

nicos. Alguns são necessários em quantidades apreciáveis — *macronutrientes* — enquanto que, de outros, bastam traços — *micronutrientes*. Dentre os primeiros temos o *fósforo*, sob a forma de fosfatos, importante no metabolismo energético e na síntese de ácidos nucleicos: o *enxofre*, necessário por fazer parte de aminoácidos como cistina e cisteína e para a síntese de vitaminas como biotina e tiamina; o *potássio*, ativador de enzimas e regulador da pressão osmótica; o *magnésio*, ativador de enzimas extracelulares e fator importante na esporulação; o *ferro*, necessário para a síntese dos citocromos e de certos pigmentos. O papel dos micronutrientes não é tão bem conhecido, dadas as dificuldades de seu estudo. Tem-se, todavia, demonstrado, em casos específicos, a necessidade de elementos como cobre, cobalto, zinco, manganês, sódio, boro e muitos outros.

Fatores de crescimento. Denominam-se fatores de crescimento os compostos orgânicos indispensáveis a um determinado microrganismo, mas que ele não consegue sintetizar. Tais fatores, portanto, devem estar presentes no meio para que o microrganismo possa crescer. Muitos desses fatores são vitaminas, em especial do complexo B; outras vezes são aminoácidos, nucleotídeos e ácidos graxos. As necessidades dos microrganismos, nesse particular, são variadíssimas.

Um dos aspectos importantes dessa indispensabilidade resulta do fato de que, quando um microrganismo exige um determinado fator, seu crescimento será limitado pela quantidade do fator presente no meio. Dentro de certos limites, o crescimento será proporcional ao teor do composto limitante. Isso permite a elaboração de um método de dosagem de certos compostos, baseado na medida do crescimento microbiano. Essa é a base da *dosagem microbiológica* de uma série de substâncias, principalmente aminoácidos e vitaminas.

1.3.4 – Água

A água não constitui um nutriente, mas é absolutamente indispensável para o crescimento dos microrganismos. Seu papel é múltiplo. Com exceção dos protozoários, capazes de englobar partículas sólidas, os microrganismos se nutrem pela passagem de substâncias em solução através da membrana citoplasmática. A água é o solvente universal. Além disso, a água exerce função primordial na regulação da pressão osmótica e, pelo seu elevado calor específico, na regulação térmica. A maior parte dos microrganismos, quando não esporulados, morre rapidamente pela dessecação.

1.3.5 – Oxigênio atmosférico

Como a água, o oxigênio atmosférico não é um nutriente e funciona apenas como receptor final de hidrogênio nos processos de respiração aeróbica. Os microrganismos têm comportamentos diferentes na presença de O_2 livre: microrganismos *aeróbios* exigem a presença de oxigênio livre; alguns, todavia,

o exigem em pequena quantidade, não tolerando as pressões normais de O_2 atmosférico; são os *microaerófilos*; microrganismos *anaeróbios* não toleram a presença de oxigênio livre, morrendo rapidamente nessas condições; microrganismos *facultativos* tanto podem crescer na presença como na ausência de oxigênio livre.

Entre as bactérias, encontramos os três tipos de comportamentos. Os fungos são aeróbios ou facultativos, raramente anaeróbios.

1.4 – Meios de cultura

1.4.1 – Considerações gerais

Nas condições artificiais do laboratório o crescimento de microrganismos é conseguido pela semeadura dos mesmos em meios de cultura, cuja composição deve atender aos princípios expostos no item anterior. Dada a variedade de tipos nutritivos, é fácil compreender que não há um meio de cultura universal. Muitas vezes, o que é exigido por um determinado microrganismo inibe totalmente o crescimento de outros; é o que sucede com a matéria orgânica necessária ao crescimento de germes heterotróficos que, na maioria das vezes, inibe totalmente a proliferação de autotróficos. Assim, para compor um meio adequado, é necessário conhecer a fisiologia dos microrganismos em estudo. Lembramos que cada microrganismo duplicado ou multiplicado deve possuir todos os componentes da célula original. Para se ter uma idéia aproximada da composição química de uma bactéria, por exemplo a *Escherichia coli*, veja a Tab. 1.2. Os números apresentados são válidos para essa bactéria, quando cultivada nas condições estabelecidas; eles não são válidos para outros microrganismos (outras bactérias ou fungos), mas servem de referencial.

1.4.2 – Composição dos meios de cultura

Basicamente existem dois grandes grupos de meios de cultura: os meios *sintéticos* e os meios *complexos*. Chamam-se meios sintéticos àqueles cuja composição química é qualitativa e quantitativamente conhecida. Considere-se, por exemplo, o seguinte meio: NH_4Cl , 1,0g; K_2HPO_4 , 1,0g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,2g; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,01g; $CaCl_2$, 0,02g; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 0,002g; $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$, 0,001g; água q.s.p., 1 L.

Temos aqui um meio que se enquadra na definição de sintético. Também está de acordo com os princípios gerais, já expostos, no que tange à fonte de nitrogênio e íons inorgânicos; não contém, entretanto, uma fonte de carbono nem fonte de energia.

Isso sucede porque o meio foi planejado para a cultura de germes fotolitotróficos: só contém material inorgânico; a fonte de carbono é o CO_2 (proveniente do ar) e a fonte de energia é a luz solar. Para que os microrganismos cresçam nesse meio, eles devem ser incubados em presença de luz e em condições de aerobiose.

Tabela 1.2 – Composição química da célula bacteriana

Macromoléculas	Massa seca (%)	Massa/célula $\times 10^{-15}$ g	Peso molecular	Número de moléculas/célula	Diferentes tipos de moléculas
Proteína	55,0	155,0	$4,0 \times 10^4$	2.360.000	1.050
RNA (total)	20,5	59,0			
23rRNA		31,0	$1,0 \times 10^6$	18.700	1
16rRNA		16,0	5×10^5	18.700	1
5rRNA		1,0	$3,9 \times 10^4$	18.700	1
transferência		8,6	$2,5 \times 10^4$	205.000	60
mensageiro		2,4	$1,0 \times 10^6$	1.380	400
DNA	3,1	9,0	$2,5 \times 10^5$	2,13	1
Lípide	9,1	26,0	705	22.000.000	4*
Lipopolissacarídeo	3,4	10,0	4346	1.200.000	1
Mucocomplexo	2,5	7,0	(904)n	1	1
Glicogênio	2,5	7,0	$1,0 \times 10^5$	4.360	1
Total de macromoléculas	96,1	273,0			
Material em solução:	2,9	8,0			
Subunidades,		7,0			
vitaminas, metabólitos		1,0			
Íons orgânicos	1,0	3,0			
Massa seca - total	100,0	284,0			

Massa de uma bactéria: $9,5 \times 10^{-13}$ g

Conteúdo aquoso: $6,7 \times 10^{-13}$ g

Massa seca de uma bactéria: $2,84 \times 10^{-13}$ g

* Há quatro classes de fosfolípidos, cada uma delas com composições variáveis de ácidos graxos.

Se a esse meio de cultura adicionarmos 0,5 g de glicose, ele continuaria a ser enquadrado na definição de sintético, mas, contendo agora uma fonte orgânica de energia e carbono (glicose), permitirá o crescimento de quimiorganostróficos como, por exemplo, *Escherichia coli*, habitante normal do intestino dos mamíferos. Trata-se de um organismo de excepcionais capacidades de síntese, pois, a partir da glicose e dos sais minerais do meio, consegue fabricar todos os componentes do protoplasma. Se quisermos, contudo, cultivar uma bactéria com características nutritivas semelhantes à *E.coli*, o bacilo tífico (*Salmonella typhi*), será necessário, além da glicose, adicionar o aminoácido triptofano; *S.typhi* não consegue sintetizar triptofano, que, para ela, como definimos

anteriormente, é um fator de crescimento. Outros aminoácidos podem ser incluídos, permitindo o crescimento de um número cada vez maior de microrganismos. O meio, contudo, ainda será considerado como sintético, pois sua composição é sempre bem definida.

Se quisermos cultivar microrganismos mais exigentes nesse meio, podemos enriquecê-lo com substâncias capazes de fornecer uma variedade grande de vitaminas e aminoácidos como, por exemplo, extrato de leveduras. Nesse momento o meio passou a ser complexo, pois contém um produto cuja composição química não é perfeitamente definida, o extrato de leveduras. Na prática, a maior parte dos meios utilizados é do tipo complexo e as mais variadas substâncias podem ser utilizadas na sua composição: peptonas, extrato de carne, extratos de órgãos animais como fígado, coração, extratos de vegetais como soja, arroz, ou outras como sangue, soro, etc.

1.4.3 – Estado físico dos meios de cultura

Os meios de cultura podem ser constituídos simplesmente por soluções de nutrientes. Geralmente os microrganismos têm maior facilidade de iniciar o seu crescimento nesse tipo de meio, principalmente se o seu número é, de início, pequeno. Quando, todavia, existe mais de um tipo de microrganismo no material semeado, o crescimento final será constituído de uma mistura destes, o que impede que se tirem conclusões a respeito da natureza e da atividade de cada um. Para que as características de um microrganismo possam ser reconhecidas ou para que a sua atividade possa ser devidamente aproveitada, ele deve se encontrar em "cultura pura", isto é, não deve ser misturado a outros.

Para que se possa separá-los num material ou numa cultura líquida, há necessidade de semeá-los na superfície de um meio sólido. Nesse caso, se o material foi adequadamente diluído e o espalhamento bem feito, cada microrganismo estará separado de seu vizinho e, multiplicando-se, formará uma colônia de organismos iguais a ele, visível macroscopicamente e facilmente transferível para novo meio, de onde crescerão em cultura pura.

Os meios sólidos são preparados adicionando-se um agente solidificador às soluções de nutrientes. O agente mais usado é o *ágar*, polissacarídeo extraído de algas, que funde a 100°C, mas somente solidifica de novo ao redor de 45°C. A adição de 1,5 a 2% de ágar ao meio de cultura líquido é suficiente para a solidificação deles. Sendo um polissacarídeo e, portanto, de natureza orgânica, o ágar poderá inibir o crescimento de certos microrganismos autotróficos. Nesses casos, usa-se como solidificador a sílica-gel.

1.4.4 – Meios seletivos e diferenciais

Meios seletivos são aqueles cujas características impedem o crescimento de certos microrganismos, permitindo apenas o crescimento de outros. O

meio descrito no item 1.4.2., por exemplo, é seletivo para fotolitotróficos. Muitas vezes a seletividade do meio depende da adição de algum composto inibidor dos indesejáveis. Assim, por exemplo, corantes básicos inibem o crescimento de bactérias gram positivas, enquanto que a azida sódica inibe as gram-negativas.

Meios diferenciais são aqueles que conferem características especiais às colônias que, em condições normais, seriam idênticas. Assim, microrganismos fermentadores de lactose, semeados em meio contendo lactose e um indicador, dão colônias de cor diferente das dos não fermentadores, pois, crescendo, fermentam a lactose, originando ácido lático, que faz "virar" o indicador.

1.4.5 – Conservação dos microrganismos

Isolado um microrganismo em cultura pura, é mister conservá-lo no laboratório para estudo ou uso futuro. Várias são as técnicas empregadas para tal fim, conforme a natureza do organismo em questão. A técnica mais comum consiste em semear em meio sólido distribuído em tubos e, periodicamente, transferi-lo para novo meio. O tempo decorrido de uma transferência para outra dependerá da resistência do microrganismo. É conveniente que o metabolismo microbiano seja reduzido tanto quanto possível, pois, nessas condições, ele permanecerá viável por tempo mais prolongado. Para se conseguir tal resultado, há vários recursos que serão aplicados, de acordo com o tipo de microrganismo em questão. Uma das técnicas mais simples consiste em se conservar as culturas à temperatura de geladeira; há germes que permanecem viáveis durante meses. Outra técnica consiste em se recobrir a cultura com uma camada de óleo mineral estéril, reduzindo dessa forma o suprimento de oxigênio e, conseqüentemente, o metabolismo microbiano. Todos esses processos, todavia, envolvem um trabalho intenso e constante, principalmente quando o número de organismos na coleção é grande. Além disso, muita atenção é necessária nas transferências, para evitar uma contaminação. Outro problema importante decorre do fato de que, com o correr do tempo, muitos microrganismos podem sofrer mutações e, com isto, terem suas características alteradas. Para se contornar esses inconvenientes, recorre-se ao processo da *liofilização*, que já exige um equipamento especial. Nesse processo, microrganismos são suspensos em um meio adequado (leite ou albumina, por exemplo), colocados em uma ampola e rapidamente congelados no mínimo a -30°C . Em seguida, procede-se à secagem do material por uma sublimação da água e, após isso, as ampolas são fechadas hermeticamente. O material pode ser conservado à temperatura ambiente. Outra técnica utilizada é a conservação em temperatura de nitrogênio líquido (-179°C). Empregando as duas últimas técnicas — liofilização e nitrogênio líquido — os microrganismos podem ser guardados durante muito tempo, até mesmo anos, sem que haja necessidade de renovação e sem alterações em suas propriedades. Um método simples de conservar fungos, é através de seus esporos. Estes são misturados à areia, solo ou sílica, previamente esterilizados.

Há instituições especializadas que identificam, armazenam e vendem bactérias, fungos e vírus. A mais conhecida é a American Type Culture Collection — ATCC.

1.5 – Crescimento microbiano

1.5.1 – Considerações gerais

Considera-se como crescimento, em sistemas biológicos, o aumento de massa resultante de um acréscimo ordenado de todos os componentes de protoplasma. Assim, aumentos de tamanho decorrentes de fenômenos como absorção de água ou acúmulo de material de reserva não podem ser considerados como crescimento. Em microbiologia, embora seja possível estudar o crescimento individual, geralmente o que se mede é o crescimento de uma população, exprimindo-se quer em termos da massa total, quer em função do número de indivíduos.

1.5.2 – Medida de crescimento

O crescimento de uma população microbiana em meio líquido pode ser determinado de várias formas.

a) *Determinação do peso seco ou úmido.* A medida do peso úmido é bastante falha, dando apenas uma idéia grosseira da massa microbiana presente. Prefere-se, por isso, a determinação do peso seco, que sendo corretamente executada, constitui o processo básico de medida de massa, servindo como referência na padronização de outros métodos. Uma amostra da suspensão microbiana é centrifugada, o sobrenadante desprezado e o sedimento celular lavado algumas vezes com água destilada ou solução salina. Após a última centrifugação, o sedimento é colocado em um vidro de relógio previamente tarado e, em seguida, secado em estufa até peso constante. Há, contudo, certas limitações inerentes a essa técnica. São necessárias amostras relativamente grandes para que as medidas tenham significado. Isso significa que não é possível acompanhar o crescimento de uma população microbiana desde as suas fases iniciais, sendo necessário esperar que a massa atinja um nível crítico. A lavagem das células antes da secagem pode levar a perdas de material e, além disso, componentes celulares solúveis podem ser retirados. O processo não pode ser aplicado quando o meio de cultura contém partículas sólidas em suspensão.

b) *Determinação química de componentes celulares.* É possível calcular a massa microbiana pela dosagem de certos componentes celulares, como proteína e ácidos nucleicos. Esses métodos podem ser muito sensíveis e, portanto, aplicáveis a amostras pequenas. Seu inconveniente maior reside no fato de ser a composição química das células microbianas, principalmente bactérias, altamente variável de acordo com as condições de crescimento: compo-

sição do meio de cultura, idade da cultura e velocidade de crescimento. Para uma dada série de condições, todavia, tais métodos são bastante sensíveis e precisos.

c) *Turbidimetria*. Consiste na medida da turvação de uma suspensão microbiana. Pode-se medir a absorbância em um espectrofotômetro ou a capacidade de dispersão da luz em um nefelômetro. Verificou-se que a turvação está relacionada com a massa de microrganismos presente. O processo é extremamente simples, permitindo que se obtenham resultados e construam curvas paralelamente ao desenvolvimento do processo. Há, contudo, fatores que interferem com a precisão do método, principalmente o tamanho das células e sua composição química, além da presença de material particulado no meio de cultura. Para obter bons resultados, é portanto necessário construir curvas de calibração, com base em determinações de peso seco, para cada conjunto de condições experimentais.

O número de organismos presentes numa suspensão também pode ser determinado, havendo para isso dois métodos principais.

1. *Contagem do número total de indivíduos*, sem levar em conta se estão vivos ou mortos. A técnica mais comum está em colocar diluições conhecidas da suspensão em câmaras de contagem e, sob o microscópio, contar diretamente o número de partículas presentes num determinado volume. Outra técnica consiste em espalhar-se uma quantidade conhecida da suspensão numa área determinada de uma lâmina, corá-la e, em seguida, contar o número de microrganismos presentes em vários campos do microscópio. Sabendo-se a área do campo, calcula-se o número na suspensão. Existem ainda aparelhos eletrônicos que contam automaticamente o número de partículas de uma suspensão.

2. *Contagem de microrganismos viáveis*. É o método mais utilizado para contagem de bactérias e leveduras, e nesse caso são feitas diluições adequadas da suspensão, semeando-se alíquotas na superfície de meios sólidos. Após um período de incubação, conta-se as colônias que cresceram. Se o espalhamento foi bem feito e homogêneo, cada colônia corresponde a uma bactéria. Levando-se em conta a diluição feita, calcula-se o número de bactérias ou leveduras vivas presentes na suspensão original. Dada a possibilidade de duas células ficarem muito próximas no momento do espalhamento, a colônia formada será a sobreposição de duas. Em vista dessa possibilidade, o método é apropriadamente chamado de contagem de *unidade formadora de colônias*.

1.5.3 – Crescimento exponencial

Quando se acompanha o crescimento de microrganismos em meio líquido, durante o espaço de tempo em que a quantidade de nutrientes é superior às necessidades destes e ainda não se acumulou uma quantidade significativa de substâncias tóxicas, verifica-se que o crescimento, na maioria dos casos, é

exponencial, isto é, o aumento de número ou massa se faz segundo uma progressão geométrica.

Tratando-se de microrganismos como bactérias, certas algas unicelulares e algumas leveduras que se multiplicam por divisão binária, temos

$$N = N_0 \cdot 2^n, \quad (1-1)$$

onde N é o número de microrganismos ao fim de n divisões (ou gerações) e N_0 é o número inicial.

Empregando os logaritmos dos números, temos

$$\log N = \log N_0 + n \log 2 \quad (1-2)$$

O número de gerações será:

$$n = \frac{\log N - \log N_0}{\log 2} \quad (1-3)$$

A velocidade exponencial de crescimento, R , é expressa pelo número de gerações na unidade de tempo:

$$R = \frac{n}{t - t_0} = \frac{\log N - \log N_0}{\log 2(t - t_0)} \quad (1-4)$$

A recíproca de R é o tempo de geração:

$$G = \frac{1}{R} = \frac{t - t_0}{n} \quad (1-5)$$

Tais equações, entretanto, somente se aplicam a microrganismos que se dividem binariamente e em condições que garantam 100% de viabilidade. Assim sendo, é mais conveniente aplicar-se uma equação mais geral, onde se leva em consideração a variação da massa X de protoplasma, em função do tempo:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad (1-6)$$

Isso significa que a velocidade de crescimento é proporcional à concentração de microrganismos num instante dado. A fração pela qual a população cresce na unidade de tempo é dada por μ , que representa a *velocidade específica de crescimento*,

$$\mu = \frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt} \quad (1-7)$$

A integração da expressão (1-6) leva a

$$\ln \frac{X}{X_0} = \mu t \quad (1-8)$$

ou

$$\ln X = \ln X_0 + \mu t \quad (1-9)$$

Transformando para logaritmos decimais,

$$\log X = \log X_0 + \frac{\mu}{2,3} \cdot t \quad (1-10)$$

Projetando-se num gráfico os valores do $\log X$ contra o tempo, obtém-se uma reta, característica do crescimento exponencial.

1.5.4 – Fases do crescimento microbiano

É óbvio que, numa cultura descontínua, as condições não permanecem ideais por muito tempo. Logo a quantidade de nutrientes começa a diminuir e produtos do metabolismo microbiano vão se acumulando cada vez mais. Essas modificações têm uma considerável influência sobre o crescimento dos microrganismos. Construindo-se um gráfico global do crescimento microbiano em cultura descontínua em meio líquido, observa-se que a curva representativa desse crescimento apresenta várias fases (Fig. 1.11).

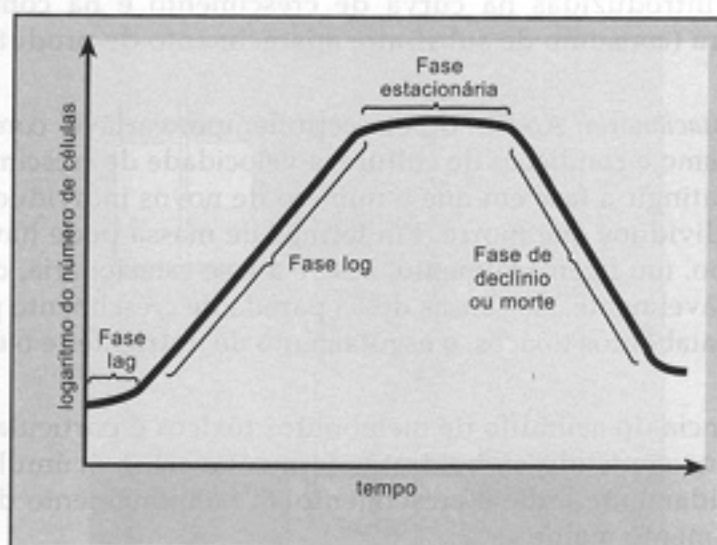


Figura 1.11 – Fases da curva de crescimento microbiano.

a) *Fase de "lag"*. Inicialmente há um período em que contagens não revelam aumento de número. Determinações de massa, todavia, geralmente demonstram que há um aumento, reflexo de um aumento no tamanho dos indivíduos. Essa fase só ocorre quando os microrganismos semeados provêm de uma cultura velha, não mais em crescimento exponencial. É a consequência de uma necessidade de renovação dos microrganismos que, em culturas ve-

lhas, já perderam certos sistemas enzimáticos por esgotamento do substrato, ou estão deficientes em ácidos nucléicos e outros componentes importantes do protoplasma. Ao serem colocados em novo meio de cultura, antes de iniciarem sua multiplicação, passam por essa fase de renovação, aumentando de tamanho em consequência da síntese de material novo. É claro que microrganismos crescendo exponencialmente, semeados em meio idêntico, não apresentam fase de *lag*; apresentá-la-ão, todavia, se o novo meio for mais pobre que o original. A semeadura de microrganismos, mesmo velhos, em meio mais rico que o original, leva na maior parte das vezes a uma supressão ou redução da fase de *lag*.

b) *Fase de crescimento exponencial (fase log)*. Nessa fase, realizam-se as condições descritas em 1.5.3. Os microrganismos se encontram na plenitude de suas capacidades, num meio cujo suprimento de nutrientes é superior às necessidades do organismo semeado. A velocidade de crescimento dX/dt é uma função da massa X e a velocidade específica μ é constante. Essa é, sem dúvida alguma, a fase mais importante do crescimento microbiano, fornecendo dados fundamentais para os estudos de fisiologia, de cinética, para os quais a velocidade específica é um parâmetro de máxima importância. Nessa fase é possível estudar a influência de uma série de fatores, analisando as modificações introduzidas na curva de crescimento e na composição do meio de cultura (consumo de substrato, aparecimento de produtos do metabolismo etc.).

c) *Fase estacionária*. Ao fim de um certo tempo, variável com a natureza do microrganismo e condições de cultura, a velocidade de crescimento vai diminuindo até atingir a fase em que o número de novos indivíduos é igual ao número de indivíduos que morre. Em termos de massa pode haver, durante um certo tempo, um ligeiro aumento. Essa é a fase estacionária, cuja duração varia consideravelmente. As causas dessa parada de crescimento podem ser o acúmulo de metabólitos tóxicos, o esgotamento de nutrientes e o esgotamento de O_2 .

A influência do acúmulo de metabólitos tóxicos é particularmente evidente em meios contendo carboidratos fermentáveis; o acúmulo de ácidos orgânicos rapidamente inibe o crescimento. O tamponamento do meio permite um rendimento maior.

O esgotamento ocorre num certo momento em que a quantidade de nutrientes torna-se insuficiente para a população microbiana existente; o crescimento cessa. Nem sempre, todavia, esse é o motivo principal; a neutralização de produtos tóxicos, a aeração ou ambos, podem promover um novo surto de crescimento, mostrando que ainda havia uma quantidade suficiente de alimento.

O esgotamento de O_2 é um fator importante apenas para microrganismos aeróbios ou facultativos. Numa cultura estacionária (sem agita-

ção), a difusão de oxigênio não se faz suficientemente depressa para suprir as necessidade daqueles localizados nas camadas mais profundas do meio.

d) *Fase de declínio*. Depois de um certo tempo, o número de organismos que morre torna-se progressivamente superior ao dos que surgem. Eventualmente a cultura se esteriliza. A duração dessa fase é, também, extremamente variável.

1.5.5 – Cultivo contínuo

O que foi descrito refere-se a um crescimento em cultura descontínua, na qual o meio de cultura não é renovado. Nesse tipo de cultura é fácil observar que, a partir do momento em que o meio é inoculado, as condições começam a variar de forma progressiva. Embora muitos estudos possam ser levados a efeito com pleno êxito nessas condições, seria ideal estudar o crescimento microbiano de maneira tal que todos os parâmetros se mantivessem constantes. Isso se tornou possível com o processo de cultura contínua, em que novo meio de cultura é adicionado constantemente ao sistema, do qual se retira um volume correspondente. Um esquema do quimiostato encontra-se na Fig. 1.12.

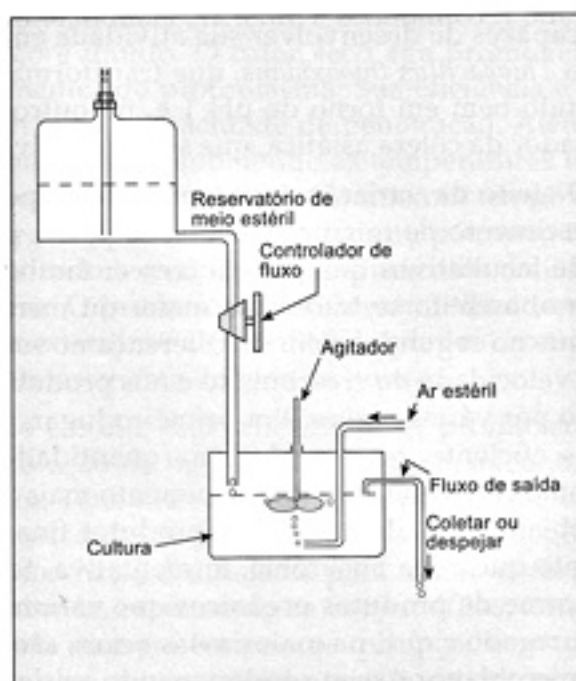


Figura 1.12 – Esquema de quimiostato.

O estudo do cultivo contínuo de microrganismos faz parte dos objetivos do Capítulo 12 do Volume 2.

1.5.6 – Fatores que influem no crescimento

a) *Temperatura*. Para todos os microrganismos existem três temperaturas cardiais: (a) temperatura mínima, abaixo da qual não há crescimento; (b) temperatura máxima, acima da qual não há crescimento e (c) temperatura ótima, onde o crescimento é máximo. Deve-se salientar que, para outras atividades microbianas, existem também temperaturas ótimas, que não coincidem necessariamente com a temperatura ótima de crescimento. De acordo com essa temperatura, os microrganismos podem ser classificados em três grandes grupos:

termófilos, cujo ótimo se localiza em torno de 60°C;

criófilos, cujo ótimo se localiza em torno de 10°C; e

mesófilos, cujo ótimo está entre 20 e 40°C.

Para microrganismos parasitas de animais de sangue quente, o ótimo, em geral, localiza-se ao redor de 37°C, enquanto que, para os habitantes do solo, cereais etc., o ótimo se situa entre 20 e 30°C.

b) *pH*. Como a temperatura, existe sempre um valor de pH ótimo e pH máximo e mínimo. A maioria dos microrganismos tem seu ótimo em torno da neutralidade. Muitos processos fermentativos, entretanto, são executados por microrganismos, que se desenvolvem melhor em valores de pH ácido em torno de 5. Raros são capazes de desenvolver sua atividade em limites extremos. Exceção notável é o *Thiobacillus thiooxidans*, que transforma enxofre em ácido sulfúrico, proliferando bem em torno de pH 1 e, no outro extremo, o *Vibrio comma*, agente causador da cólera asiática, que se desenvolve em pH 10.

c) *Oxigênio*. O efeito da variação na quantidade disponível de oxigênio se faz sentir no crescimento de microrganismos aeróbios, para os quais é indispensável, e no de facultativos que podem crescer também na ausência de O₂. No primeiro caso, o efeito se traduz no maior ou menor rendimento da cultura, enquanto que no segundo, além da diferença no rendimento, há diferenças sensíveis na velocidade do crescimento e nos produtos da atividade do microrganismo. Isso por várias razões. Em primeiro lugar, o metabolismo aeróbio é muito mais eficiente, fornecendo uma quantidade muito maior de energia, que tem como consequência um crescimento mais rápido. Em segundo lugar, a via aeróbia tem geralmente como produtos finais do metabolismo CO₂ e água, enquanto que a via anaeróbia, fermentativa, tem como produtos finais uma série enorme de produtos orgânicos que variam de acordo com o microrganismo empregado e que, na maioria das vezes, são de natureza a inibir o crescimento microbiano. Assim sendo, quando se deseja obter grandes massas de microrganismos, o processo usual consiste em se promover uma aeração vigorosa da cultura, quer por borbulhamento de ar, quer por agitação, ou ambos simultaneamente. Como já foi mencionado no início, tais métodos só influenciam o crescimento de aeróbios ou facultativos.

d) *Agitação*. Uma das consequências da agitação é promover uma melhor aeração do meio, favorecendo o crescimento de aeróbios e facultativos. Além disso, entretanto, a agitação promove uma homogeneização dos nutrientes no meio de cultura e uma dispersão dos produtos metabólicos, o que também favorece o crescimento de maneira apreciável, inclusive de microrganismos anaeróbios.

1.6 – Controle dos microrganismos pela ação dos agentes físicos

1.6.1 – Considerações gerais

Denomina-se *esterilização* o processo pelo qual são mortos, inativados irreversivelmente ou retirados todos os organismos de um material ou suspensão, inclusive as formas esporuladas. Geralmente os processos empregados para esse fim são processos físicos, por serem mais eficientes e, com algumas exceções, menos dispendiosos que os químicos.

1.6.2 – Temperatura

De todos os processos empregados para matar microrganismos, o calor é, sem dúvida alguma, o mais eficiente e econômico. Pode ser empregado de duas maneiras: seco e úmido. O calor seco age promovendo uma oxidação violenta de componentes do protoplasma. Sua eficiência é comparativamente baixa, pois não tem muita capacidade de penetração. Além disso, não é todo tipo de material que pode ser submetido às temperaturas necessárias para esterilização pelo calor seco (160 a 180°C durante um tempo mínimo de uma ou duas horas). Emprega-se para vidraria, óleos ou pós; nem todo material metálico pode ser esterilizado a seco; certos instrumentos delicados podem perder o corte ou a tempera. O processo da *flambagem*, utilizado nos laboratórios de microbiologia para esterilizar alças e fios de platina, consiste em passar-se o material diretamente na chama do bico de Bunsen.

O calor úmido é muito mais eficiente. Age promovendo a desnaturação de proteínas e dissolução de lipídeos, o que também contribui para intensificar o primeiro efeito. Tem alta capacidade de penetração e pode ser utilizado para uma grande variedade de materiais, inclusive biológicos. À temperatura de 60°C, durante uma hora, é suficiente para matar as formas vegetativas de todos os microrganismos, excetuando-se os termófilos, naturalmente. A 100°C as formas vegetativas morrem em poucos minutos; se mantida essa temperatura durante 15 minutos, morre também a maioria dos esporos. Há, contudo, esporos, principalmente de saprófitas, que podem resistir ao aquecimento a 100°C durante várias horas, suportando mesmo temperaturas um pouco mais altas. Para matar qualquer tipo de microrganismo, inclusive todos os tipos de esporos, emprega-se vapor d'água aquecido a 120°C, sob uma pressão de uma

atmosfera acima da normal, durante 20 minutos. O aparelho utilizado para esse fim é a *autoclave*, que consiste num recipiente de paredes resistentes onde se coloca o material. O vapor poderá ser produzido pelo aquecimento da água contida na própria autoclave ou ser introduzido por tubulação adequada. Para que o processo seja eficiente, é indispensável que se evite mistura de ar ao vapor e que o material esteja acondicionado e distribuído de forma conveniente.

A *pasteurização* consiste no aquecimento a 62°C por 30 minutos, seguido de um resfriamento brusco. Não é um processo de esterilização, tendo sido inicialmente empregado para destruir os microrganismos patogênicos presentes no leite. Além disso, utiliza-se esse método para interromper certos processos microbiológicos industriais quando estes atingem um certo ponto. É o que sucede na fabricação da cerveja, por exemplo.

De um modo geral, os microrganismos são mais resistentes ao frio do que ao calor. Com algumas exceções, a temperatura de geladeira (4°C) pode ser empregada para a conservação de culturas. Temperaturas inferiores a 0°C podem ser letais para microrganismos. O congelamento lento promove a formação de cristais de gelo, que perfuram a membrana e a parede celular. A alternância de congelamento e descongelamento é um processo bastante eficiente para lesar e matar microrganismos. O congelamento brusco a temperaturas inferiores a -30°C não leva à formação de cristais, e os microrganismos geralmente sobrevivem durante muito tempo nessas condições principalmente se o processo é seguido de um dessecamento a vácuo. Essa é a técnica da liofilização, empregada para a conservação de microrganismos e de material biológico em geral.

1.6.3 – Radiações

De interesse prático pela sua atividade letal sobre microrganismos são as radiações *ultravioleta* (UV) e as radiações chamadas *ionizantes*.

As radiações UV, principalmente as de comprimento de onda entre 240 e 280 nm, são absorvidas pelas purinas e pirimidinas dos ácidos nucleicos, provocando mutações. Anéis aromáticos de aminoácidos também absorvem radiações, levando à inativação de enzimas. Ambos os efeitos podem levar a célula à morte. Na prática, empregam-se lâmpadas de mercúrio como fonte de radiações UV. O seu emprego em lugares públicos, salas de operação, berçários, enfermarias e salas assépticas, tem sido bem sucedido. Os resultados demonstram que há uma redução apreciável das contaminações e das infecções cruzadas. Precaução indispensável é evitar a incidência direta da luz ultravioleta sobre as pessoas, pois ela produz, conforme o tempo de exposição, queimaduras graves e lesões severas da córnea.

As radiações ionizantes exercem atividade de forma diferente, pois atingem os átomos e são incomparavelmente mais eficientes. Enquanto que, para

se matar uma célula de *Escherichia coli* são necessários 10^6 quanta, no caso dos raios UV, apenas 1 quantum é suficiente quando se trata de radiações ionizantes. Seringas, agulhas e outros materiais descartáveis têm sido esterilizados por esse processo.

1.6.4 – Filtração

A passagem de soluções ou gases através de filtros de poros suficientemente pequenos que retêm microrganismos pode ser empregada na remoção de bactérias e fungos, deixando entretanto passar a maioria dos vírus.

As velas porosas de porcelana foram muito usadas no passado e atualmente são empregadas membranas filtrantes de nitrocelulose e acetato de celulose para esse fim.

A filtração tem como principais aplicações a esterilização de soluções termossensíveis e na entrada de salas ou ambientes onde qualquer microrganismo do ar é indesejável. Muito comum é a esterilização do ar que é borbulhado em meios de cultura, sendo bastante empregados filtros de lã de vidro.

1.6.5 – Vibrações sônicas

Sons audíveis têm uma frequência que não ultrapassa 2,4 kHz; entre 9,0 e 200,0 kHz, as frequências são supersônicas e acima de 200,0 kHz, ultra-sônicas. Muitos microrganismos são sensíveis a vibrações ultra-sônicas, sendo destruídos por lise e extravasamento do conteúdo celular. Uma das explicações para o fato baseia-se no fenômeno da cavitação: os gases dissolvidos em líquidos submetidos a tais vibrações saem de solução sob a forma de microbolhas e estas, violentamente agitadas, chocam-se contra as paredes microbianas, rompendo-as. O emprego da sonicação para a ruptura de microrganismos tem sido útil, por permitir a obtenção de frações independentemente de um tratamento químico ou térmico e isentas de partículas inertes, como a alumina.

1.7 – Controle pela ação de agentes químicos

1.7.1 – Considerações gerais

Classicamente, os agentes químicos empregados para matar ou inativar microrganismos são classificados em dois grandes grupos: desinfetantes e agentes quimioterápicos.

Desinfetantes. São substâncias que agem diretamente sobre estruturas microbianas, causando a morte do microrganismo. Não matam necessariamente todos microrganismos. Devem diminuir o número, de tal forma que os indesejáveis não representam mais um risco para o processo. As principais estruturas e moléculas alvo são a membrana citoplasmática, sensível aos agentes capazes de dissolver os lipídeos que a compõem, e as proteínas enzimáticas ou estruturais. Os mecanismos de ação são os mais diversos, como

oxidantes, desnaturantes, alquilantes, etc. Pelo fato de agirem sobre estruturas e moléculas comuns a todas as células, quer de microrganismos, quer de seres superiores, os desinfetantes são tóxicos gerais, não possuindo especificidade para este ou aquele microrganismo, não podendo ser introduzidos nos organismos superiores. É claro que nem todos os microrganismos são igualmente sensíveis, mas o que sucede, em geral, é que quando um microrganismo é mais resistente, ele o é a todos os desinfetantes indiscriminadamente. É o que acontece, por exemplo, com *Pseudomonas aeruginosa*. Certos desinfetantes, tendo uma ação menos tóxica, podem ser usados na superfície de tecidos vivos. Nesse caso particular, tomam o nome de antissépticos.

Agentes quimioterápicos. São substâncias que interferem, na grande maioria dos casos, em determinadas *vias metabólicas*, isto é, a ação dos agentes quimioterápicos se restringe às células de microrganismos que possuem a via metabólica sensível. Assim, por exemplo, a sulfanilamida age competindo com o ácido p-aminobenzóico, que é um metabólito essencial para a síntese do ácido fólico. Células ou microrganismos incapazes de sintetizar ácido fólico são resistentes àquele agente. Os agentes quimioterápicos podem ser *sintéticos*, como é o caso das sulfas, ou naturais, como os antibióticos, sendo então produzidos por microrganismos; é o caso da penicilina, estreptomicina, tetraciclina, etc.

Tanto para os desinfetantes como para os quimioterápicos, há a possibilidade do agente ser *microbicida*, determinando a morte do microrganismo, ou *microbiostático*, apenas impedindo sua proliferação. Em muitos casos, essa distinção é pouco nítida e a mesma substância, dependendo da dose e do tempo de contato em que foram empregados, poderá agir de uma ou de outra forma.

Deve-se ressaltar que, em tecnologia industrial, o termo desinfetante é utilizado para designar *qualquer agente químico empregado num processo microbiológico para inibir ou matar microrganismos contaminantes indesejáveis*. Tanto podem ser utilizados agentes do primeiro grupo (desinfetantes) como do segundo (quimioterápicos).

1.7.2 – Determinação da potência dos desinfetantes

O processo empregado obrigatoriamente é a determinação do chamado *coeficiente fenólico*. Consiste na comparação, em condições padronizadas, da atividade de um desinfetante qualquer com a atividade do fenol, considerado como padrão. A relação entre o inverso da diluição de desinfetante que mata o microrganismo empregado (*Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa* ou *Staphylococcus aureus*) em um determinado tempo e o inverso da diluição de fenol que mata o mesmo microrganismo, nas mesmas condições e no mesmo tempo, constitui o coeficiente fenólico. Apesar de tal determinação ser obrigatória por lei, o coeficiente fenólico é um índice extremamente precário da atividade de um desinfetante, a não ser que ele seja, também, de natureza fenólica. Isso porque desinfetantes diferentes, tendo mecanismos de ação dife-

rentes, serão afetados de forma diversa pelas condições de uso. Assim, tem grande influência na atividade dos desinfetantes o fator de diluição. Verificou-se ser válida a equação

$$C^n \cdot t = K$$

onde C é a concentração, t o tempo, n o coeficiente de diluição e K uma constante. Desinfetantes como o fenol e derivados têm $n = 1$. Isso significa que, sendo diluído à metade, o tempo necessário para se obter o mesmo efeito será o dobro. Já o bicloreto de mercúrio tem $n = 6$. Sendo diluído à metade, o tempo de ação aumentará sessenta e quatro vezes. Por esse motivo, atualmente se prefere avaliar a atividade dos desinfetantes com provas realizadas nas condições de uso.

Outros fatores influem consideravelmente na atividade dos desinfetantes: temperatura, pH, presença de sais e, principalmente, presença de proteínas estranhas. Certos agentes, extremamente ativos "*in vitro*", perdem quase totalmente sua atividade, quando em presença de material orgânico contendo proteína, em virtude de sua grande afinidade por ela. É o que sucede, por exemplo, com os compostos de mercúrio.

1.7.3 – Principais grupos

Não há uma classificação única aceita, de tal forma que apresentaremos os agentes químicos em grupos que tenham em comum as funções químicas (álcoois, aldeídos, etc.), ou elementos químicos (halogênios, metais pesados, etc.), ou mecanismos de ação (agentes oxidantes, agentes de superfície, etc.). Cabe lembrar ainda que cada um dos compostos citados abaixo pode ter seu emprego como esterilizante, desinfetante, antisséptico ou até conservante, devendo no entanto serem consultados livros especializados quanto à concentração, tempo de contato e modo de emprego.

Álcoois: etílico, isopropílico, propilenoglicol, etilenoglicol.

Aldeídos: fórmico (formol), glutárico.

Fenóis: fenol, cresol, timol, clorocresol, cloroxilenol.

Ácidos orgânicos: acético, lático, benzóico, capróico.

Halogênios: iodo, cloro, ácido hipocloroso, cloraminas, hipoclorito.

Metais pesados: sais de mercúrio, prata, cobre, zinco.

Agentes oxidantes: água oxigenada, permanganato de potássio.

Agentes de superfície: cloreto de benzalcônio, cloreto de benzetônio, cloreto de cetil-piridíneo, clorohexidina.

Gases: óxido de etileno, óxido de propileno, Beta-propil-lactona, dióxido de cloro, ozona.

Bibliografía

- NEDHARDT, F.C.; INGRAHAM, J.L.; SCHAECHTER, M. **Physiology of the bacterial cell**. Sinauer Associates, Inc. Publishers, 1990.
- BROCK, T.D.; MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J.; **Biology of Microorganisms**, Prentice-Hall, 7th edition, 1994.
- TALARO, K.; TALARO, A. **Foundations in Microbiology**. Wm.C. Brown Publishers, 1993.
- PRESCOTT, L.M.; HARLEY, J.P.; KLEIN, D.A. **Microbiology**. Wm.C. Brown Publishers, 2nd edition, 1993.
- GERHARDT, P.; MURRAY, R.G.E.; WOOD, W.A.; KRIEG, N.R. **Methods for general and molecular bacteriology**. American Society for Microbiology, 1994.

2

TÉCNICAS BÁSICAS EM MICROBIOLOGIA

M. Ligia C. Carvalhal

2.1 – Segurança no laboratório

Em microbiologia, trabalhar bem significa trabalhar com segurança.

Qualquer estudante ou profissional que utiliza microrganismos no seu trabalho deve estar consciente de que está manuseando organismos vivos; entre estes podem estar incluídos organismos patogênicos ou potencialmente patogênicos. Um bom profissional deve conhecer, portanto, as normas de segurança que norteiam o trabalho em um laboratório, antes mesmo do início de qualquer atividade prática. Listamos aqui algumas regras importantes no exercício do trabalho em laboratório de biotecnologia.

1) Ao entrar no laboratório colocar livros, casaco e outros objetos de uso pessoal em local apropriado, nunca sobre a bancada de trabalho.

2) Enquanto no laboratório, vestir sempre um avental, abotoado ou fechado de forma a cobrir a maior parte do corpo. Não sair do laboratório com o mesmo.

3) Fechar portas e janelas durante o trabalho em laboratório de microbiologia, para evitar contaminações originadas pelas correntes de ar.

4) Limpar e desinfetar a bancada antes e após o seu uso. As paredes e o chão do laboratório também devem estar sempre bem limpos.

5) Lavar as mãos com sabão ou detergente, antes e depois de executar o trabalho.

6) Não colocar nada na boca. Não comer, beber ou fumar dentro do laboratório. Para pipetar, usar pipetadores de borracha ou automáticos.

7) Prender os cabelos, quando longos, para evitar o contato com a chama do bico de gás.

8) Descartar todo o material contaminado em local apropriado e seguro. Tratando-se de pipetas, lâminas, etc., deixá-las mergulhadas em solução desinfetante apropriada por tempo determinado, antes de ser efetuada a lavagem e esterilização dos mesmos.

9) Evitar a produção de aerossóis que possam conter microrganismos vivos, pois estes podem ser fontes potenciais de contaminação e de infecção. Aerossóis são partículas, líquidas ou sólidas medindo apenas alguns micrômetros, que permanecem, em função do seu diminuto tamanho, suspensas no ar, podendo ser inaladas pelas pessoas que estão no local. Para evitar os riscos originados pela formação de aerossóis, o procedimento recomendado é o uso de câmaras especiais para a prática com microrganismos (Vol.2, Cap.5).

10) Manter sempre a atenção no trabalho que está sendo executado, a fim de evitar acidentes.

11) Ao carregar tubos no laboratório, nunca colocá-los no bolso mas sim acondicioná-los em estantes. O mesmo deve ser feito com placas e outros materiais, que devem ser transportados em bandejas apropriadas.

12) Após a quebra de qualquer recipiente contendo microrganismos, cobrir imediatamente o local com toalhas de papel saturadas com solução desinfetante. Deixar atuar durante pelo menos 15 min.

13) A manipulação de fungos deve ser rápida e eficiente, para evitar a contaminação do ambiente com esporos.

2.2 – Preparo de meios de cultura

Chamamos de meio de cultura o conjunto de nutrientes necessários para que ocorra a multiplicação ou manutenção dos microrganismos.

Um meio de cultura pode ser utilizado para o crescimento (multiplicação), para a manutenção ou mesmo para o transporte de microrganismos. Quando utilizados para o crescimento, devem conter todos os nutrientes necessários, para que sejam sintetizadas as novas estruturas celulares. Todavia, antes de serem semeados, os meios de cultura devem ser esterilizados, ou seja, devem estar isentos de qualquer organismo vivo. Os métodos utilizados para a esterilização dos meios de cultura variam conforme as características do próprio meio (Ver Cap.1, item 1.6.).

O que é um inóculo? O que é inocular? O que é uma cultura?

Para cultivar um microrganismo como a *Escherichia coli*, por exemplo, recorreremos a um meio de cultura esterilizado (isento de formas vivas) e adicionamos a ele uma pequena quantidade de material contendo células vivas

desta bactéria: a este material, damos o nome de *inóculo* e à adição do inóculo ao meio estéril chamamos de *inoculação* (os instrumentos utilizados e procedimentos envolvidos com a inoculação serão descritos posteriormente). Após a inoculação, o meio de cultura é incubado (acondicionado) por tempo determinado, sob condições apropriadas de oxigenação, temperatura, etc. Para que as condições de incubação favoreçam o crescimento do microrganismo inoculado, o microbiologista deve conhecer previamente as características fisiológicas do microrganismo estudado. Durante a incubação ocorre a multiplicação do microrganismo dando origem a uma *cultura*.

De acordo com o estado físico, os meios de cultura têm usos específicos e devem ser acondicionados de forma apropriada.

Os meios de cultura podem ser líquidos, sólidos ou semi-sólidos. Os meios sólidos diferem dos meios líquidos pelo seu aspecto gelatinoso, devido à presença de ágar (um polissacarídeo extraído de algas) ou de gelatina. O ágar é mais usado que a gelatina, pois, além de não ser atacado pela grande maioria dos microrganismos, não é liquefeito em temperaturas normalmente usadas para o crescimento dos microrganismos (em torno de 30 a 35°C). A gelatina, ao contrário, pode liquefazer-se pela ação de gelatinases produzidas por microrganismos ou mesmo quando submetida a temperaturas em torno de 35°C. Variando a concentração de ágar no meio de cultura, podemos obter um meio *sólido* (15 a 30g/L) (quando a placa é invertida não ocorre derramamento) ou *semi-sólido* (2 a 10g/L). Alguns meios de cultura sólidos não contêm ágar ou gelatina. Um exemplo é o meio de *Dorset* contendo ovo, meio usado para a manutenção de *Mycobacterium tuberculosis*. Os meios de cultura líquidos podem ser acondicionados em tubos ou frascos com tampas plásticas ou metálicas, de rosca, de encaixe, ou de algodão envolvido em gaze (Fig. 2.1.).



Figura 2.1 – Tubos com vários tipos de tampas: (a) tubo de ensaio; (b) tampa de plástico; (c) tampa de rosca; (d) tampa de metal; (e) tampão de algodão hidrófobo.

Os meios sólidos, ao contrário dos líquidos, podem ser acondicionados em tubos ou frascos na posição horizontal ou inclinada, ou em placas de Petri de vidro ou de plástico do tipo descartáveis ou reutilizáveis (Fig. 2.2.). O meio líquido pode ser esterilizado dentro de um tubo ou de um frasco. O mesmo não ocorre com o meio sólido quando em placa. Para se obter uma placa com meio de cultura sólido, este deve ser previamente esterilizado em frasco apropriado e, a seguir, quando ainda líquido (temperatura em torno de 50°C), derramado dentro de uma placa esterilizada. Ao se preparar tubos ou frascos com meios de cultura do tipo sólido e inclinado, estes poderão ser esterilizados dentro do tubo a ser utilizado e, após esterilização, inclinado até o seu resfriamento.

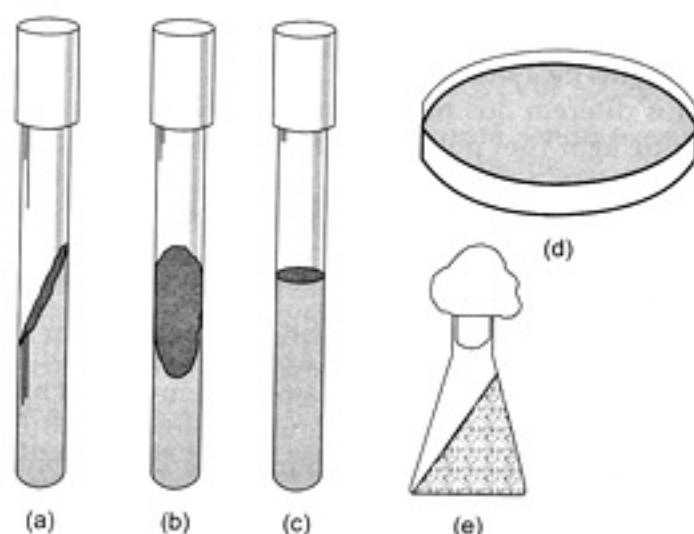


Figura 2.2 – Meio de cultura sólido acondicionado em: (a) tubo de ágar inclinado — vista lateral; (b) tubo de ágar inclinado — vista frontal; (c) tubo de ágar não inclinado; (d) placa de Petri; (e) erlenmeyer com ágar inclinado.

Tipos de meios de cultura: basal, de enriquecimento, seletivo, diferencial, sintético ou quimicamente definido, complexo e de transporte.

Os meios de cultura devem ser utilizados de acordo com os objetivos do experimento. A composição química (qualidade e quantidade de nutrientes) de um meio de cultura pode variar em uma ordem de grandeza quase infinita. Ao cultivarmos uma bactéria quimiolitotrófica (ver Cap.1, item 1.3), por exemplo, podemos recorrer a um meio de cultura contendo simplesmente uma solução de sais inorgânicos tendo o CO_2 como fonte de carbono. Já uma bactéria quimiorganotrófica, como a *E. coli*, necessita da presença de um substrato orgânico como fonte de energia e carbono. Muitos microrganismos são capazes de crescer e multiplicar em um meio de cultura *basal* (Tab. 2.1.). Outros, mais exigentes, só crescerão se, ao meio basal, forem acrescentados outros nutrientes. Chamamos de meio de *enriquecimento* o meio basal acrescido de outros nutrientes. Os meios de enriquecimento são usados quando quere-

mos promover o crescimento de um determinado microrganismo e/ou inibir o crescimento de outros. Por exemplo, consideremos uma amostra de fezes de um indivíduo com suspeita de uma doença causada por *Salmonella typhi*. Nessa amostra, além de possíveis células dessa bactéria, existe um grande número de outros microrganismos que formam a microbiota intestinal. Trata-se assim de um inóculo contendo apenas algumas células de um determinado microrganismo que queremos isolar e, por outro lado, um grande número de outros microrganismos indesejáveis. O caldo de selenito, cuja composição é apresentada na Tab. 2.1., inibe o crescimento de muitas bactérias entéricas (incluindo a *E.coli*), porém não inibe o crescimento de *S.typhi*. Ao inocuarmos uma amostra das fezes nesse meio de cultura, após incubação por tempo adequado a proporção de células de *S. typhi* será favorecida, a ponto de conseguirmos detectar a sua presença mais facilmente. O meio de selenito, além de ser um meio de enriquecimento, é também um meio *seletivo*, pois permite o crescimento preferencial de alguns microrganismos em detrimento de outros.

O meio Mac Conkey (Tab. 2.1.) é um exemplo de meio de cultura *seletivo* e ao mesmo tempo *diferencial*. Meio de cultura diferencial, como o próprio nome indica, é aquele que permite diferenciar uma espécie de outra pelo aspecto macroscópico de seu crescimento, ou seja, por diferenças no aspecto das colônias como cor, textura, halo de hemólise, etc. No meio Mac Conkey, por exemplo, bactérias entéricas, capazes de fermentar a lactose, originam colônias vermelhas, devido aos produtos ácidos que alteram o indicador presente no meio; espécies que não fermentam a lactose originam colônias incolores. No meio ágar sangue, microrganismos produtores de hemolisina podem ser separados de espécies não produtoras desta enzima, pela presença de um halo de hemólise ao redor da colônia onde a enzima produzida lisou as hemácias de carneiro contidas no meio.

Alguns meios de cultura contêm substâncias como peptona ou extrato de levedura, cuja composição química não pode ser definida quantitativamente. Existem, em microbiologia, situações onde há necessidade de termos um meio de cultura com composição química absolutamente conhecida, até mesmo em relação aos micronutrientes. Esses meios de composição definida são chamados meios *sintéticos* ou *quimicamente definidos* e devem ser preparados a partir das substâncias puras. Usamos um meio definido quando queremos, por exemplo, estudar os nutrientes essenciais para o crescimento de um determinado microrganismo. Os meios de cultura, quando não são quimicamente conhecidos, são chamados de *complexos*.

Os meios de transporte são aqueles utilizados para o armazenamento e manutenção temporária de determinado material (por exemplo, um "swab"), que será posteriormente examinado e pesquisado para a presença de determinado microrganismo. A principal função desse tipo de meio é manter a viabilidade dos possíveis microrganismos presentes, ainda que não favoreça a sua multiplicação, o que muitas vezes não é aconselhável, considerando os produtos metabólicos tóxicos que se acumulam no meio.

Tabela 2.1 – Tipos de meios de cultura e suas respectivas composições químicas.

MEIOS DE CULTURA	COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO MEIO (g/l)
<i>Meios basais:</i>	
Água de peptona	Peptona (produto solúvel resultante da hidrólise de proteínas), 10; cloreto de sódio, 5.
Caldo nutriente	Peptona, 10; cloreto de sódio, 5; extrato de carne, 10.
Ágar nutriente	Caldo nutriente solidificado com ágar, 15.
Ágar Sabouraud glicose	Peptona, 10; dextrose, 40; ágar, 15.
<i>Meios de enriquecimento:</i>	
Ágar sangue	Ágar nutriente acrescido de sangue desfibrinado ou citratado, 50 a 100mL/L de meio.
Caldo selenito	Peptona, 5; manitol, 4; fosfato dibásico de sódio, 10; selenito de sódio (NaHSeO_3), 4.
<i>Meios seletivos:</i>	
Ágar deoxicolatocitrato	Extrato de carne e peptona, 10; citrato de sódio, 10; citrato férrico de amônio, 1; deoxicolato de sódio, 5; vermelho neutro, 0,02; ágar, 15.
Caldo Mac Conkey	Peptona, 20; lactose, 10; cloreto de sódio, 5; taurocolato de sódio, 5; vermelho neutro, 0,03.
<i>Meios diferenciais:</i>	
Ágar Mac Conkey	Caldo Mac Conkey acrescido de ágar, 15.
Ágar amido	Amido, 10; extrato de carne, 3; peptona 5; ágar, 15.
<i>Meio de transporte:</i>	
Ágar glicerol	Glicerol, 5; extrato de levedura, 2; fosfato dibásico de potássio, 1; ágar, 15.

Os meios de cultura devem ser preparados e esterilizados seguindo procedimentos básicos.

A maior parte dos meios de cultura estão disponíveis comercialmente na forma de pó. Para meios líquidos o pó é simplesmente pesado e dissolvido em água destilada ou deionizada. Quando se trata de meios sólidos (por exemplo, ágar nutriente), após pesagem e dissolução em água, o meio deve ser aquecido até a total dissolução do ágar. Uma vez acondicionados em frascos apropriados e esterilizados por autoclavagem (Cap.1, item 1.3.), são subseqüentemente esfriados a aproximadamente 45°C e derramados em placas previamente esteri-

lizadas. Calcula-se aproximadamente 20 a 25 mL de meio para placas de 9,0 cm de diâmetro. As placas não devem ser mexidas nem removidas, até que o meio esteja totalmente solidificado. Algumas técnicas de semeadura exigem que a superfície do meio sólido esteja isenta de líquido. Uma maneira de prevenir a evaporação do meio é derramá-lo na placa com temperatura em torno de 50°C (o suficiente para que não ocorra a solidificação antes de completar a camada). Quando permanecerem gotas na superfície do meio, estas poderão ser eliminadas mantendo-as com a tampa ligeiramente aberta dentro de uma estufa a 37°C ou em uma câmara de fluxo laminar. Alguns meios contendo nutrientes termolábeis não podem ser esterilizados por autoclavação. Utiliza-se para tanto o sistema de filtração (Fig. 2.3).



Figura 2.3 – Sistema de esterilização por filtração.

2.3 – Técnicas de assepsia

As técnicas de assepsia impedem a contaminação de instrumentos e meios de cultura antes e durante o seu manuseio.

As técnicas de assepsia envolvem os procedimentos responsáveis pela esterilização de instrumentos a serem utilizados (por exemplo, quando submetemos a alça e fio de inoculação à queima pelo calor da chama do bico de Bunsen — Fig. 2.4a e 2.4f) e os procedimentos responsáveis pela manutenção da condição de esterilidade, ou seja, pelo impedimento do contato dos materiais com objetos ou superfícies não estéreis como os dedos, a superfície da bancada, etc. Dessa forma, frascos esterilizados, vazios ou não, devem ser mantidos sempre fechados, sendo abertos pelo menor tempo necessário para a sua utilização. Para evitar a contaminação de um material (seja este um

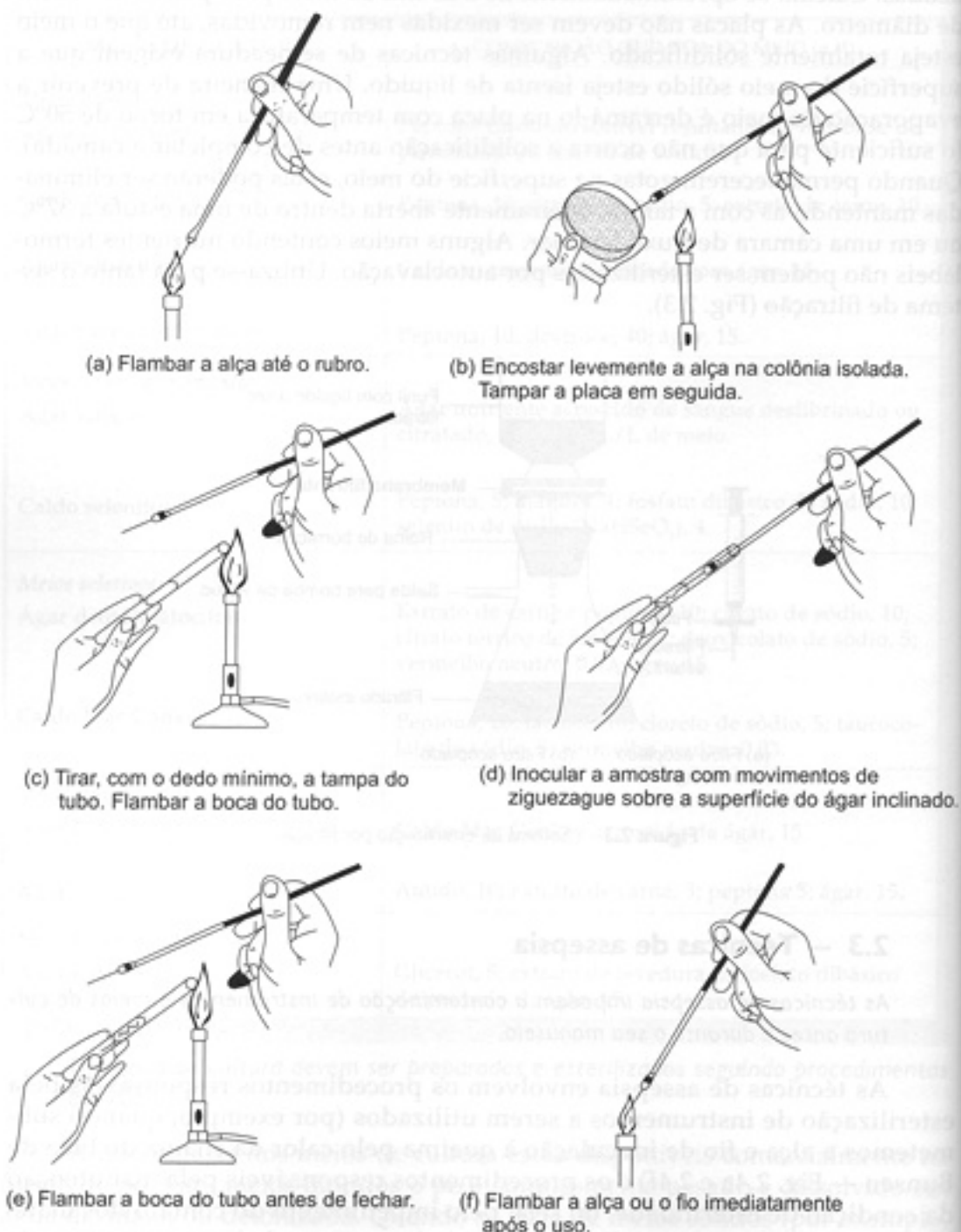


Figura 2.4 – Técnicas de assepsia utilizadas para a inoculação de microrganismos. (Figura adaptada do livro *Microbiology. A Laboratory Manual*, 1996, 4ª ed. Cappuccino/Sherman. The Benjamin/Cummings Publ. Comp., Inc.)

frasco estéril ou um frasco contendo uma cultura pura, por exemplo), a borda do tubo deve ser rapidamente passada na chama do bico de Bunsen imediatamente após a sua abertura e antes de ser fechado (Figs. 2.4c e 2.4e). Essa prática evita que eventuais organismos vivos, presentes nessa região, caiam dentro do frasco, contaminando o meio ou a cultura. Esse procedimento chama-se *flambagem* (Cap. 1, item 1.6.2) e deve ser utilizado durante a retirada de amostras, inoculações ou sementeiras em meios estéreis contidos em tubos ou frascos. Lembramos aqui a necessidade de adotar um sistema seguro para que a tampa não fique exposta à contaminação, por exemplo, quando a deixamos erradamente sobre a bancada. Para tanto, aconselha-se o uso do dedo mínimo para segurar a tampa do tubo durante todo o tempo de manuseio (Fig. 2.4c, d e e).

Para evitar a contaminação de um meio de cultura sólido, contido em placa, existem técnicas de assepsia apropriadas.

Para tanto, a tampa da placa deve ser mantida sobre a bancada com a borda para cima, o mais próxima possível da chama do bico de Bunsen, enquanto a placa contendo o meio de cultura é segura com a mão esquerda também perto da chama (Fig. 2.4b). Como alternativa, pode ser utilizado o procedimento descrito na Fig. 2.8, onde a tampa é aberta sem a separação total da base da placa.

2.4 – Instrumentos do microbiologista

Para inocular ou repicar os microrganismos recorreremos a instrumentos especiais.

As técnicas que envolvem a transferência de microrganismos de um local para outro utilizam os seguintes instrumentos (Fig. 2.5): *alça e fio (agulha) de platina ou de níquel-cromo e pipetas Pasteur e sorológica*. Esses instrumentos são encontrados atualmente na forma reciclável ou na forma esterilizada e descartável com gotas de volumes pré-determinados (no caso da alça e das pipetas Pasteur). *Palitos longos* de madeira também podem ser utilizados desde que devidamente esterilizados em forno ou autoclave. A alça e o fio devem ser esterilizados imediatamente antes e após o seu uso. Para isso, as partes metálicas devem permanecer na chama do bico de Bunsen até atingir o rubro (Figs. 2.4a e 2.4f). Antes do contato com a cultura, a fim de impedir a destruição dos microrganismos, a alça ou o fio devem ser esfriados em superfície estéril (superfície interna do tubo ou da placa) ou no ambiente, desde que trabalhando em câmara de fluxo de ar).

* *Atenção! A flambagem não deve ser adotada quando os líquidos utilizados têm características inflamáveis!*

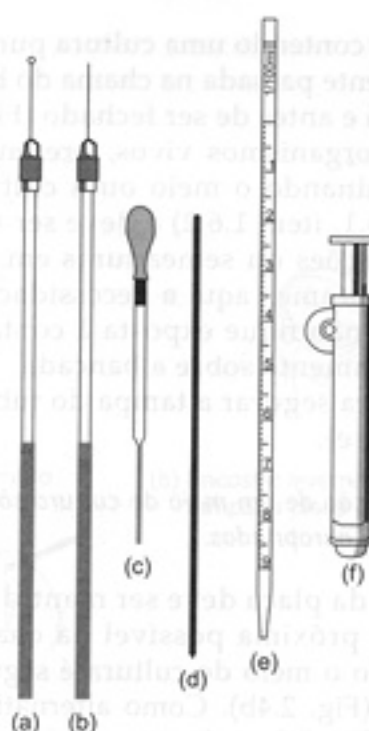


Figura 2.5 – Instrumentos utilizados para inoculações. (a) alça de platina, de níquel-cromo ou de inoculação; (b) fio ou agulha de platina, de níquel-cromo ou de inoculação; (c) pipeta Pasteur; (d) palito de madeira (tipo churrasquinho); (e) pipeta sorológica; (f) pipetador mecânico com bomba de plástico.

2.5 – Métodos de inoculação

Procedimentos para inoculação com líquidos contendo microrganismos.

Quando uma alça estéril é mergulhada em uma suspensão contendo microrganismos e a seguir retirada do meio, forma-se na alça uma película líquida circular, contendo um determinado número de microrganismos. Essa “alçada” é chamada de inóculo; o tamanho deste inóculo vai depender de dois fatores perfeitamente controláveis: concentração de células na suspensão (ver item 2.8.) e diâmetro da alça (normalmente comportam volumes que variam de 0,005 a 0,01 mL). O fio de platina também pode ser um instrumento para inocular suspensões, uma vez que um pequeno volume de líquido fica aderido ao metal. A pipeta Pasteur e a pipeta sorológica podem ser usadas para inocular volumes variáveis conforme a sua calibragem, desde que acopladas a sistemas pipetadores ou peras de borracha que garantam a segurança no trabalho (Fig. 2.5.).

2.5.1 – Inóculos líquidos em meios líquidos

A partir de uma suspensão contendo microrganismos, podemos inocular meios líquidos, mergulhando nestes uma “alçada” contendo os microrga-

ismos. Da mesma forma, esse tipo de inoculação pode ser feito com pipetas sorológicas ou do tipo Pasteur, simplesmente gotejando o inóculo lentamente no meio líquido a ser inoculado. Imediatamente após a inoculação (Fig. 2.4e,f), as alças e os fios devem ser novamente flambados até o rubro, para prevenir a contaminação do indivíduo ou do ambiente de trabalho. Com igual finalidade, as pipetas devem ser imediatamente imersas em solução desinfetante.

2.5.2 – Inóculos sólidos em meios líquidos

A alça e o fio de platina podem ser usados para retirar pequenas quantidades de material sólido, por exemplo, microrganismos provenientes de uma colônia em meio de cultura sólido (Fig. 2.4b.). Para tanto, basta tocar a alça ou o fio no material; a quantidade de material ou o número de microrganismos retirados na superfície da alça ou do fio não é mensurável e, conseqüentemente, este método de inoculação só poderá ser usado quando este parâmetro não for importante. A alça ou o fio contendo os microrganismos são mergulhados no meio líquido e lentamente agitados para a liberação do inóculo.

2.5.3 – Líquidos ou sólidos em meios sólidos

Meios sólidos podem ser inoculados de muitas maneiras, dependendo do objetivo específico. Listamos a seguir algumas técnicas mais comuns e seus respectivos objetivos.

2.5.3.1 – Semeadura para obtenção de colônias isoladas ou semeadura em estrias

Essa técnica é usada quando o inóculo (líquido ou sólido) contém diferentes microrganismos ou muitos microrganismos de uma mesma espécie e desejamos obter colônias bem separadas. Nessa técnica o inóculo é progressivamente espalhado, de forma a promover a separação das células na superfície do meio sólido. A Fig. 2.6. mostra, esquematicamente, a sequência de procedimentos a serem seguidos para a obtenção de colônias isoladas: como mostra a Fig. 2.6, durante a semeadura em estrias a alça deve ser mantida na posição correta, a fim de evitar rasuras no ágar. Entre cada estria, A, B ou C, a alça deve ser flambada para eliminar os microrganismos remanescentes na mesma. Como o método parte do princípio de que cada célula origina uma colônia, após incubação por tempo determinado, o espaço onde as células tiverem sido suficientemente separadas umas das outras apresentará colônias isoladas. Cada colônia isolada corresponde a uma cultura pura.

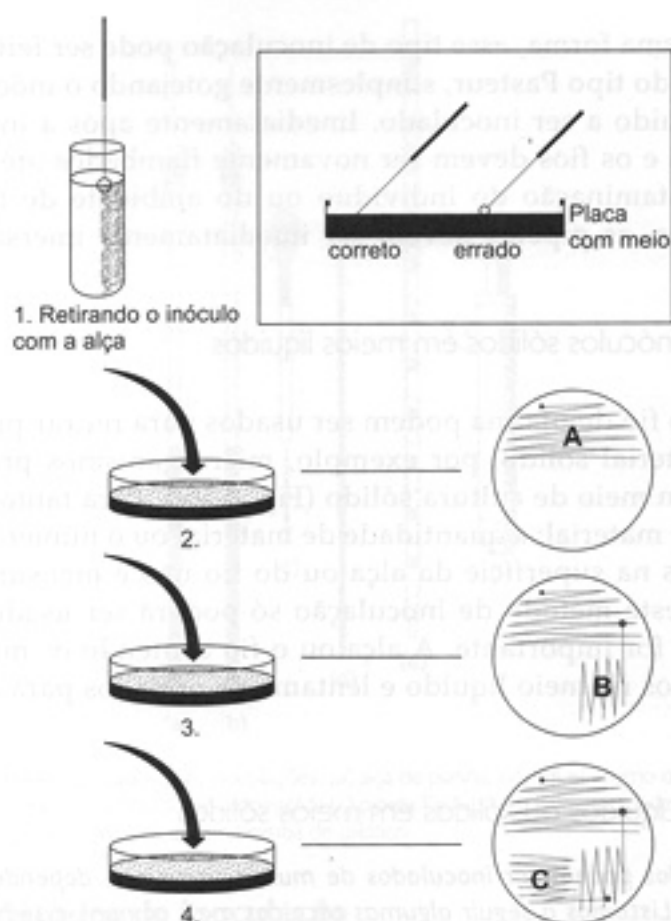


Figura 2.6 – Técnica de semeadura em estrias para a obtenção de colônias isoladas. A figura dentro do quadro mostra a posição correta da alça durante a semeadura. 1) Com a alça retira-se o inóculo da suspensão. 2) Inocular com a alça contendo os microrganismos a superfície do ágar em estrias com movimentos em ziguezague, conforme esquema em A. 3) Repetir o procedimento seguindo esquema em B. 4) Repetir o procedimento seguindo esquema em C.

2.5.3.2 – Semeadura em profundidade e superfície

Esse método é usado quando queremos crescer microrganismos simultaneamente, em condições de semi-anaerobiose e em aerobiose. Para isso, usamos o *meio sólido inclinado em tubo* (Fig. 2.2.). Espetamos o fio de platina contendo o inóculo na base do meio de cultura sólido, retirando-o em seguida e passando lentamente em zigue-zague pela superfície do mesmo meio (Fig. 2.4d). Dessa forma, o inóculo fica distribuído na base (condição de anaerobiose) e na superfície do meio (condição de aerobiose).

2.5.3.3 – Semeadura com espalhamento em superfície

Também chamada de semeadura para contagem de colônias, esta técnica consiste no espalhamento de um inóculo contido em um pequeno volume (normalmente entre 0,05 e 0,1mL) sobre a superfície de um meio de cultura só-

lido em placa. Para garantir o espalhamento de colônias isoladas para a contagem, o inóculo deve ser previamente diluído e espalhado com uma alça de Drigalski (bastão de vidro em forma de L) com movimentos leves e homogêneos (Fig. 2.7.).

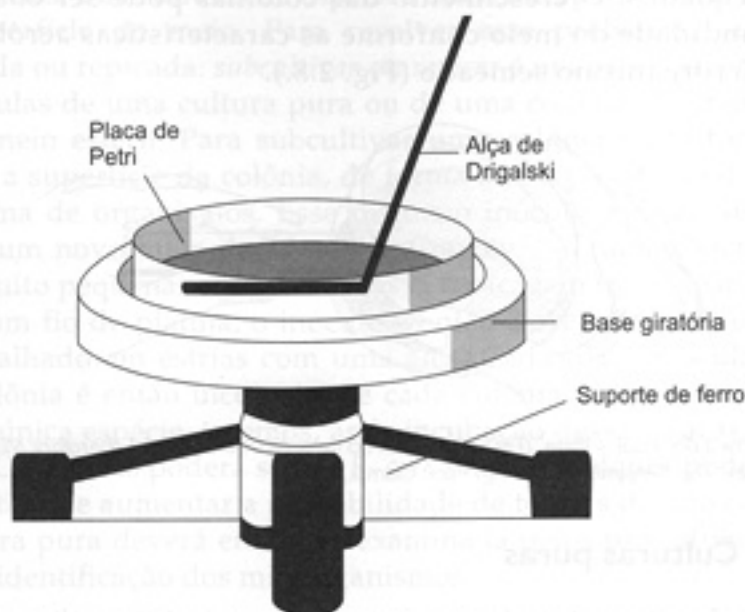


Figura 2.7 – Semeadura com espalhamento em superfície com alça de Drigalski. Enquanto uma das mãos movimenta a alça sobre a superfície do ágar, a outra mão gira a base do suporte, promovendo um espalhamento mais homogêneo e uniforme do inóculo.

2.5.3.4 – Semeadura em camada

Essa técnica tem como objetivo a obtenção de um crescimento abundante em toda a superfície do meio de cultura sólido contido em placa, erlenmeyer ou outro frasco. Para tanto, pode ser utilizado um inóculo líquido ou sólido contendo um número grande de células. A semeadura pode ser feita por derramamento de determinado volume e posterior espalhamento. Para o espalhamento podem ser usados diferentes instrumentos, como "swab" (pedaço compactado de algodão preso na ponta de um palito de madeira ou de metal), alça de Drigalski, alça de platina ou mesmo por combinação dos instrumentos (Exemplo: primeira inoculação com o "swab" contendo o inóculo e espalhamento subsequente com alça de platina).

2.5.3.5 – Semeadura por derramamento

Com o mesmo objetivo da técnica descrita no item 2.5.3.2, esta técnica é usada para obtenção de crescimento em condições de aerobiose (superfície do meio) e anaerobiose (profundidade do meio) em meio de cultura sólido contido em placa de Petri. Para tanto, o inóculo é semeado em

meio sólido estéril fundido, em tubo (aproximadamente 20ml — temperatura em torno de 40°C). Imediatamente após a adição do inóculo, o meio é derramado em placa já esterilizada, até cobrir homogeneamente todo o fundo da mesma. Após esfriamento, a placa é incubada por tempo e temperatura adequados. O crescimento das colônias pode ser observado em toda a profundidade do meio conforme as características aeróbias e anaeróbias do microrganismo semeado (Fig. 2.8.).

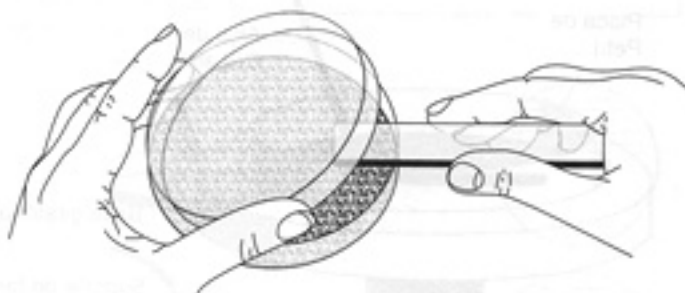


Figura 2.8 – Técnica do "Pour – Plate" (Figura adaptada do livro: *Microbiology, A Laboratory Manual*, 1996. 4ª ed. Cappuccino/Sherman. The Benjamin/Cummings Publ. Comp., Inc.).

2.6 – Culturas puras

A partir de uma mistura de organismos podemos preparar culturas puras, desde que utilizemos técnicas adequadas.

Para obtermos culturas puras de uma determinada espécie ou linhagem a partir de uma mistura de organismos, temos que usar procedimentos que envolvem técnicas de *isolamento*. O exemplo a seguir descreve e ilustra a situação presente pelo isolamento de *E. coli*, a partir de uma amostra de água de esgoto (normalmente o esgoto possui uma variedade de microrganismos entéricos e não entéricos).

Inicialmente uma alçada da água de esgoto é semeada em estrias na superfície de uma placa contendo ágar Mac Conkey (ver Fig. 2.6., item 2.5.3.1.). A seguir a placa é incubada por 18–24 horas a 37°C. As placas devem ser incubadas na forma invertida, para que as gotas de água geradas durante a incubação não pinguem sobre o meio de cultura, prejudicando o isolamento. Durante a incubação, as células que estão separadas e que forem capazes de crescer nesse meio de cultura originarão colônias individuais. Após 24 horas em ágar Mac Conkey, células de *E.coli* dão origem a colônias redondas, vermelhas, com aproximadamente 2–3mm de diâmetro; todavia, nem todas as colônias com esta aparência serão obrigatoriamente de *E.coli*. O próximo passo é escolher algumas dessas colônias para exame mais detalhado. Como *E. coli* é bastante comum nesse tipo de material, é provável que algumas destas colônias pertençam a bactérias do gênero *E. coli*. Antes de

proceder à identificação, é necessário certificar-se que cada colônia selecionada contém células de uma mesma espécie de organismo. Existe sempre a possibilidade de uma determinada colônia, mesmo bem separada, poder conter células de duas espécies diferentes; isto pode acontecer se, durante a semeadura em estrias, duas células de espécies diferentes permaneceram muito juntas na superfície do meio. Para resolver esse problema, cada colônia é subcultivada ou repicada; *subcultivar* ou *repicar* é um procedimento através do qual as células de uma cultura pura ou de uma colônia são transferidas para um novo meio estéril. Para subcultivar uma colônia basta tocar levemente com a alça a superfície da colônia, de forma a obter a adesão de uma quantidade mínima de organismos. Esse pequeno inóculo é então semeado novamente em um novo meio de ágar Mac Conkey. Algumas bactérias formam colônias muito pequenas e, nesses casos, a repicagem torna-se mais fácil se for feita com um fio de platina; o inóculo é então carregado para o novo meio e depois espalhado em estrias com uma alça. Cada placa inoculada com uma simples colônia é então incubada. Se cada colônia vermelha repicada representa uma única espécie, teremos, após incubação dessas placas, várias culturas puras. Uma delas poderá ser de *E. coli*. Outros repiques poderão ser feitos com o objetivo de aumentar a probabilidade de termos de fato culturas puras. Cada cultura pura deverá então ser examinada pelos procedimentos adequados para a identificação dos microrganismos.

2.7 – Meios de cultura e condições de incubação para anaeróbios

Para que ocorra a multiplicação dos microrganismos anaeróbios os meios inoculados devem ser incubados em condições apropriadas.

2.7.1 – Incubação anaeróbia em jaras

Microrganismos anaeróbios devem ser mantidos em ausência de oxigênio. Essa condição pode ser alcançada com o uso de *jaras de anaerobiose*. Um tipo de jarra de anaerobiose muito utilizada atualmente é uma jarra de plástico, cilíndrica, com uma tampa firmemente fixada. Após enchimento da jarra com as placas inoculadas (Fig. 2.9.), adiciona-se água aos pacotes contendo substâncias químicas. Imediatamente após a adição da água, esses são jogados dentro da jarra, que é imediatamente tampada por rosqueamento. As substâncias químicas liberam hidrogênio que, na presença do catalisador, combina com o oxigênio dentro da jarra. Como nesse caso não se estabelece uma situação de vácuo, as placas podem permanecer na posição invertida, evitando assim a condensação de água na superfície do meio. A maioria das jaras de anaerobiose contém um indicador redox, que indica o estado de anaerobiose dentro da jarra. Em jaras de metal esse indicador é colocado em pequenos vidros em um braço lateral da jarra, enquanto em jaras de plástico existe um pedaço de algodão embebido no indicador visível pelo lado externo.

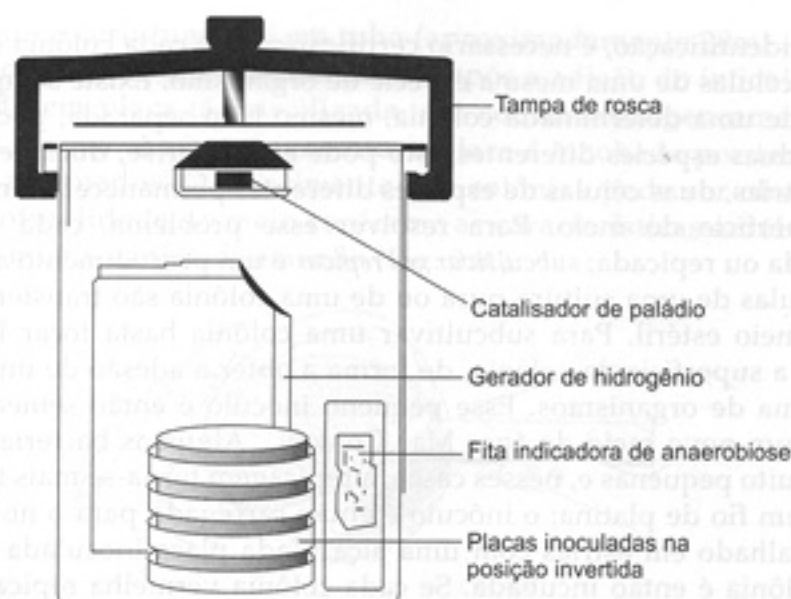


Figura 2.9 – Jarra para o cultivo de microrganismos anaeróbios.

2.7.2 – Meios de cultura para anaeróbios

Alguns microrganismos anaeróbios podem crescer em meios de cultura apropriados, como é o caso do meio de Robertson (carne de coração picada (10g/L), peptona (10g/L), cloreto de sódio (5g/L) e um agente redutor, por exemplo, cisteína ou tioglicolato); o meio é esterilizado por autoclavação e mantido em frascos com tampa de rosca.

2.7.3 – Câmaras para o trabalho com anaeróbios

A utilização de câmaras para o trabalho com microrganismos anaeróbios permite que amostras de culturas sejam retiradas em condições controladas de ausência de oxigênio, temperatura, umidade e CO₂. A manipulação das amostras no interior da câmara é feita com o auxílio de luvas fixadas no painel frontal.

2.8 – Métodos utilizados para quantificar os microrganismos

Existem vários métodos a serem utilizados quando queremos saber o número de microrganismos em uma cultura ou suspensão.

2.8.1 – Técnicas de diluição

O número de microrganismos em uma população pode variar dentro de uma ampla escala. Como consequência, muitas vezes torna-se impossível a quantificação de uma população de microrganismos, tanto por contagem dire-

ta em câmaras, como por semeadura em meio de cultura sólido (métodos descritos posteriormente). Para reduzir o número de microrganismos em uma amostra, usamos as técnicas de diluição. Estas consistem em pipetar uma fração da amostra em tubo contendo outro líquido (diluyente), geralmente água destilada estéril ou solução salina isotônica (NaCl, 8,5g/L) esterilizadas. O cálculo do fator de diluição é feito dividindo o volume inicial da amostra pelo volume total, após mistura da mesma com o diluyente.

Assim,

$$\text{Fator de diluição} = \frac{\text{Volume da amostra}}{\text{Volume total (amostra + diluyente)}}$$

Exemplo: 1,0 mL de uma cultura de bactérias é pipetado em 9,0 mL de solução salina (NaCl, 8,5g/L). O fator de diluição, neste caso, pode ser identificado por 1:10, 1/10 ou 10^{-1} . Se 1,0 mL da diluição 10^{-1} for pipetado em outro tubo contendo 9,0 mL de solução salina, o novo fator de diluição a partir da amostra inicial será 1:100 ou 1/100 ou 10^{-2} (Fig. 2.12a).

2.8.2 – Contagem do número total de células (vivas e mortas)

O número total de células é usualmente determinado por contagem em câmaras calibradas observadas com microscópio, ou por "contadores" (Coulter counter), onde os organismos são contados eletronicamente. As contagens em câmaras são menos precisas, porém mais simples e mais baratas que as contagens eletrônicas. Outros métodos, como a contagem em esfregaços corados e turbidimetria, também podem ser utilizados para a obtenção do número total de microrganismos. Ressaltamos que os métodos de contagem do número total de células envolvem a contagem de células vivas e mortas. Em amostras líquidas, essas contagens são expressas em número de células/mL.

2.8.2.1 – Câmaras de contagem

Para a contagem em câmaras, os organismos patogênicos ou móveis devem ser previamente mortos pelo calor ou por ação de uma solução contendo formalina (solução contendo formol 0,5% em volume).

Uma das fontes de erro desse tipo de contagem está relacionada com a adesão dos microrganismos à pipeta, de vidro ou de plástico, ou à sua aglutinação em líquidos ácidos. Essas dificuldades podem ser resolvidas, suspendendo os organismos em solução salina contendo traços de um detergente aniônico (por exemplo, o Teepol) tamponado com Na_2HPO_4 a pH 7,5. Para evitar a contaminação da suspensão por outros microrganismos não desejáveis, adiciona-se formalina. Recomenda-se a lavagem da câmara imediatamente após o uso, para evitar a secagem do material no vidro e posterior interferência com novas contagens. A Fig. 2.10 apresenta um esquema de uma câmara de contagem típica.

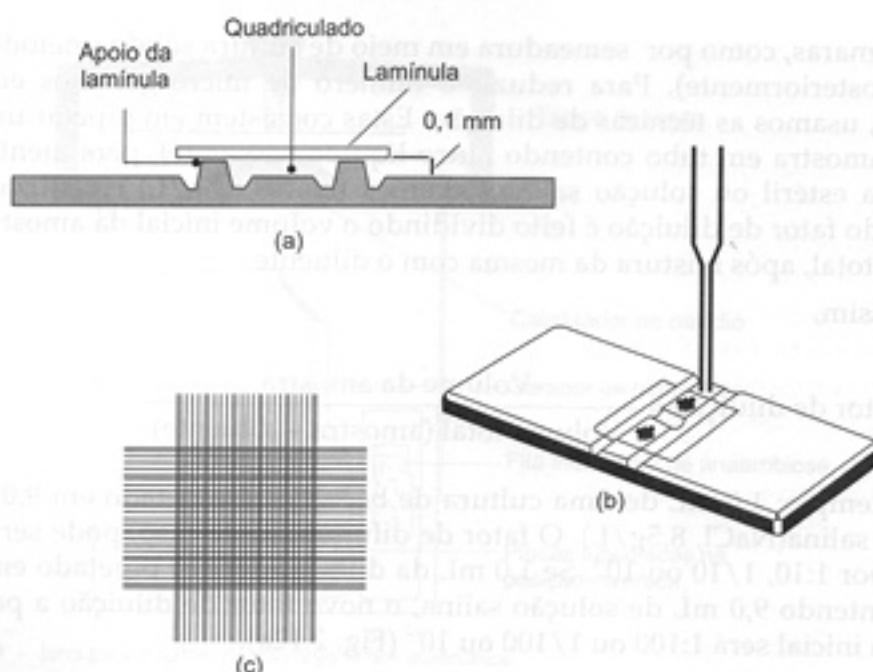


Figura 2.10 – Uma câmara de contagem típica. (a) Vista lateral: consiste numa lâmina grossa de vidro retangular com uma cavidade central de 0,1 mm abaixo do nível das laterais. A plataforma central é separada dos ombros laterais por uma cavidade de cada lado. (b) Vista superior: na superfície de cada metade da plataforma central existe um quadrado dividido em 400 pequenos quadrados, cada um de $1/400 \text{ mm}^2$. Uma lâmina deve ser posicionada e comprimida sobre as bordas laterais da câmara; para ter o contato apropriado, a lâmina deve ser escorregada levemente pela superfície enquanto estiver sendo pressionada. (Figura adaptada do livro: *Bacteria in Biology, Biotechnology and Medicine* de Paul Singleton – Ed. John Wiley & Sons, 4.^a ed, 1997.)

A utilização de uma câmara com os padrões apresentados na Fig. 2.10 deve ser feita conforme os procedimentos: uma pipeta Pasteur contendo um pequeno volume da suspensão de microrganismos (coluna de líquido com não mais que 10 mm) é colocada como indicado na Fig. 2.10b. A ponta da pipeta deve se apoiar na plataforma central e o lado da pipeta encostar na lâmina. Com a pipeta nessa posição o líquido é automaticamente conduzido por capilaridade para dentro do espaço coberto pela lâmina e parte do espaço da plataforma; é importante que o líquido não extravase. Algumas vezes é necessário bater levemente na ponta da pipeta para que o líquido comece a sair. Após 30 minutos de repouso, a contagem pode ser feita em microscópio. O cálculo do número total de partículas pode ser obtido em células/unidade de volume. Um exemplo prático: cada pequeno quadrado do quadriculado mede $1/400 \text{ mm}^2$. Como a distância entre a grade e a lâmina é $1/10 \text{ mm}$, o volume do líquido em cada quadrado pequeno é $1/4.000 \text{ mm}^3$, isto é, $1/4.000.000 \text{ mL}$. Suponhamos, por exemplo, que após contagem de 400 quadrados pequenos foram contadas 500 células; isto daria uma média de $500:400 = 1,25$ células/quadrado pequeno, ou seja, 1,25 células por $1/4.000.000 \text{ mL}$. A amostra continha então $1,25 \times 4.000.000$ células/mL, ou seja, 5×10^6 células/mL. A média

de várias contagens representa o resultado. Se a amostra, por estar muito concentrada, for diluída antes de ser examinada, o fator de diluição deve ser considerado no resultado final. Assim, se foi feita a diluição de 1/10, a contagem deve ser multiplicada por 10.

2.8.1.2 – Contagem em Coulter — counter

O Coulter — counter é composto por duas câmaras, um sistema de detecção de partículas e um analisador (Fig. 2.11). Para serem contadas, as partículas (ou células, no caso) devem ser suspensas em um fluido condutor que passa de uma câmara para outra através de uma abertura minúscula por onde passa também uma corrente elétrica. Cada vez que uma bactéria, ou qualquer outra partícula passa pelo orifício, instantaneamente muda a resistência do sistema. Essa mudança é detectada e medida por eletrodos contidos nas duas câmaras. A grandeza da alteração da tensão elétrica é proporcional ao volume da partícula. Esse instrumento permite contar rapidamente um grande número de partículas diminuindo o erro de contagem.

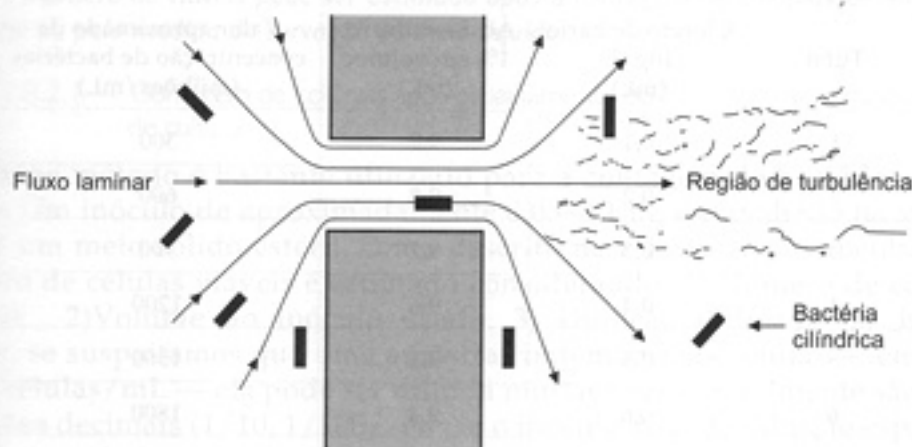


Figura 2.11 – Coulter - counter. Passagem de uma suspensão contendo microrganismos cilíndricos através do orifício que separa as duas câmaras. As linhas com setas representam as linhas de força.

2.8.1.3. Contagem em esfregaços corados

Neste método, uma gota de suspensão de volume conhecido (usualmente 0,01mL) é espalhada sobre uma área de 1cm² na superfície de uma lâmina de vidro. A seguir a gota é secada, fixada e corada. A contagem é feita ao microscópio. O número total de organismos em 0,01mL é o número de organismos em cada campo observado, dividido pela área do campo em cm². Como é esperado, os organismos não se distribuem homogeneamente na gota, permanecendo mais concentrados no centro do que nas bordas. Por esta razão, a contagem deve ser feita em toda a área da gota para a obtenção de um valor médio.

2.8.1.4 – Método da turbidimetria. Comparação visual com tubos de turvação padrão

O número total de microrganismos em uma amostra pode ser estimado por turbidimetria. Nesse método, a turvação de uma suspensão de microrganismos é comparada com tubos contendo concentrações crescentes de sulfato de bário (Tab. 2.2. — Escala de Mac Farland); a turvação dos tubos varia de transparente (tubo 1) a translúcido, o turvo atingindo o opaco (tubo 10). Para um determinado microrganismo (geralmente bactérias ou leveduras), a turvação apresentada em um tubo corresponde à turvação de uma suspensão com um número conhecido de células. A amostra deve ser observada em tubos de dimensões iguais ao tubo contendo a suspensão padrão. A turvação da amostra é comparada visualmente com a de um determinado tubo da série padrão e o cálculo da concentração de células na amostra é feito a partir de uma tabela que acompanha o conjunto de tubos padrões.

Tabela 2.2 – Preparação da escala de Mac Farland (Tabela traduzida e adaptada do livro: *Microbiology. A Laboratory Manual* de Cappuccino/Sherman. 4.^a ed. The Benjamin/Cummings Publ. Comp., Inc., 1996.).

Tubo	Cloreto de bário 10g/L (mL)	Ácido sulfúrico 1% em volume (mL)	Valor aproximado da concentração de bactérias (milhões/mL)
1	0,1	9,9	300
2	0,2	9,8	600
3	0,3	9,7	900
4	0,4	9,6	1200
5	0,5	9,5	1500
6	0,6	9,4	1800
7	0,7	9,3	2100
8	0,8	9,2	2400
9	0,9	9,1	2700
10	1,0	9,0	3000

2.8.2 – Contagem do número de microrganismos vivos

A contagem de viáveis mede a concentração de células vivas. Todavia, o seu significado está condicionado ao conceito do que é vivo em microbiologia. A definição mais aceita para o trabalho com microrganismos é a de *viabilidade* como o poder de formar colônias macroscópicas em meio de cultura sólido ou de tornar

turvo um meio de cultura líquido. As limitações desta definição devem ser consideradas, na medida que existem situações em que sabidamente está ocorrendo multiplicação celular com produção de microcolônias muitas vezes não visíveis a olho nu. É o caso, por exemplo, de microcolônias formadas por algumas bactérias como o *Streptococcus sp*, quando cultivados em determinados meios de cultura.

A maioria dos métodos que estimam o número de células viáveis envolvem a inoculação de amostras (geralmente diluídas) em meios sólidos. Após incubação, o número de células no inóculo pode ser estimado pela contagem das colônias que se formam na superfície ou no interior do meio de cultura. Para tanto, admite-se que cada colônia foi originada em uma simples célula; o número de células que dão origem a uma colônia depende, em parte, do meio de cultura utilizado, das condições de incubação e das características de cada espécie. Por isso, o termo célula foi substituído por *Unidade Formadora de Colônia* (UFC).

O número de viáveis pode ser estimado após a contagem de colônias em meio sólido ou pela medida da turvação do meio líquido.

2.8.2.1 – Contagem de colônias após espalhamento do inóculo na superfície do meio de cultura

Esse método é bastante utilizado para a contagem de bactérias e leveduras. Um inóculo de aproximadamente 0,05–0,1 mL é espalhado na superfície de um meio sólido estéril, como descrito na Fig. 2.7. Após incubação, o número de células viáveis é estimado considerando: 1) Número de colônias (UFCs). 2) Volume do inóculo usado. 3) Diluição utilizada (se houve). Assim, se suspeitamos que uma amostra contém muitas células — em torno de 10^6 células/mL — ela pode ser diluída muitas vezes (geralmente são feitas diluições decimais (1/10, 1/100/, etc.) e o inóculo de cada diluição espalhado sobre uma placa separadamente. Com certeza, pelo menos uma das diluições fornecerá um número contável de colônias. A Fig. 2.12a apresenta um exemplo de utilização dessa técnica: com uma pipeta estéril, transferir 1 mL da suspensão para um frasco contendo 9,0 mL de solução salina estéril (primeiro frasco). Homogeneizar a mistura. Transferir, com uma nova pipeta, 1 mL do primeiro frasco para o segundo frasco. Repetir a operação até alcançar o número de diluições necessário para a semeadura em meio sólido. Pipetar, a partir de cada diluição, 0,1 mL em meio de cultura sólido e espalhar com a alça de Drigalski (Fig. 2.7.). Após incubação das placas, a contagem das colônias deverá ser feita considerando-se que o número de colônias estatisticamente válido é de 30 a 300 para uma placa de 9 cm de diâmetro. O fator de diluição e o volume do inóculo devem ser considerados para o cálculo do resultado final. A placa que apresentar colônias devidamente separadas é escolhida para a contagem. A Fig. 2.12a apresenta um caso com três placas semeadas com diluições crescentes.

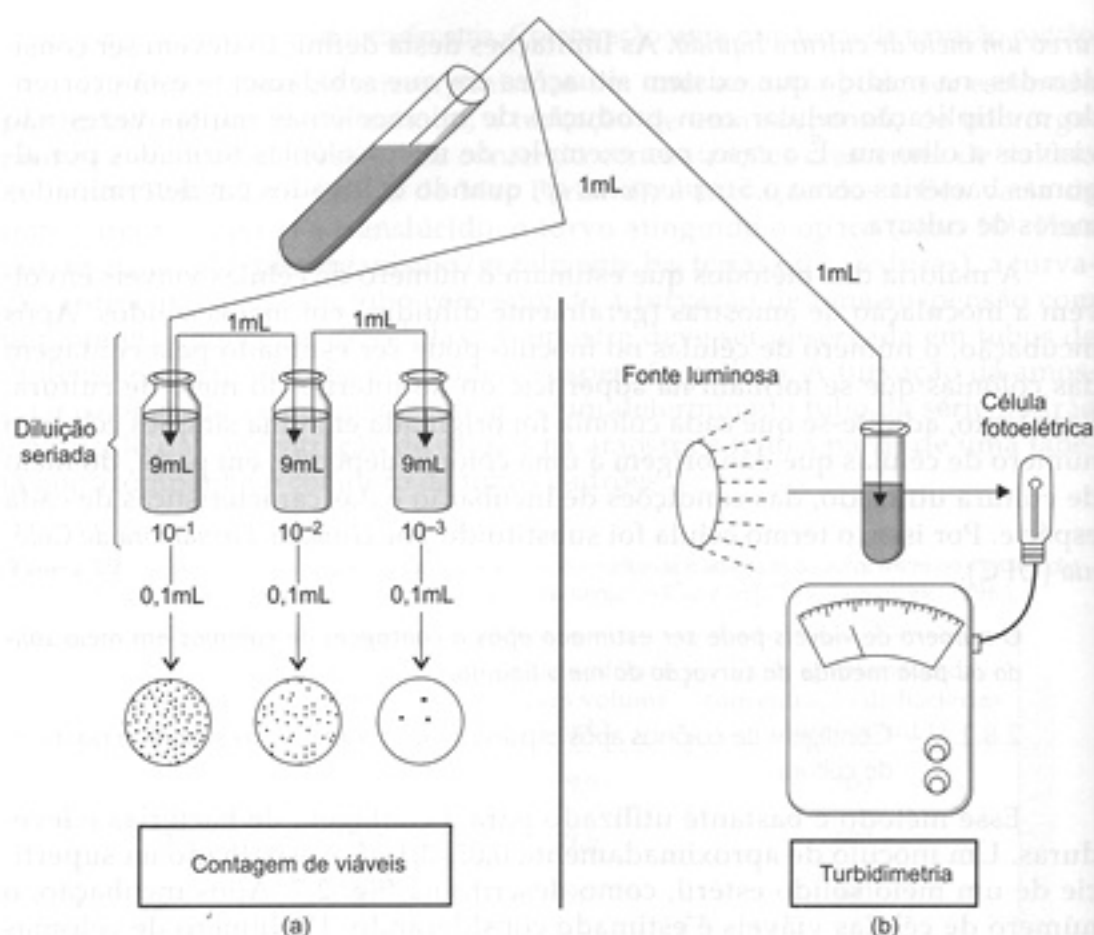


Figura 2.12 – Métodos utilizados para a quantificação de microrganismos. (a) Contagem de viáveis. (b) Turbidimetria. O desenho apresenta um modelo esquemático de um espectrofotômetro.

2.8.2.2 – Contagem de colônias após derramamento do meio inoculado em placa. Método do "Pour Plate"

Neste método o inóculo líquido é misturado com o ágar fundido (45°C) contido em um tubo ou frasco, que então é derramado no interior da parte basal de uma placa de Petri esteril (ver item 2.5.3.5 – Fig.2.8). Após solidificação do meio e incubação da placa por tempo adequado, as colônias crescerão sobre e dentro do ágar, tornando possível a contagem do número total de colônias viáveis como no método anterior.

2.8.2.3 – Contagem de colônias após inoculação com gotas. Método "Miles e Misra"

Nesse método a estimativa do número de células vivas é obtida a partir da contagem de colônias originadas pelas células contidas nas gotas. Inicialmente a amostra é diluída e uma gota de volume conhecido, proveniente de cada diluição, é pipetada em local predeterminado na superfície seca do meio de cultura sólido. As placas são mantidas em repouso até secagem das gotas e, a seguir, invertidas e incubadas em temperatura adequada até o crescimen-

to visível das colônias. As gotas que contêm um número grande de células apresentarão crescimento, porém, pela proximidade das células, estas não originarão colônias suficientemente isoladas, impedindo assim a sua contagem. Qualquer gota contendo menos de 15 células vivas dará origem a um número de colônias contáveis. Nesse método o tempo de incubação é crítico, uma vez que as colônias podem se fundir rapidamente, inviabilizando a contagem. Considerando, como nos demais métodos, que cada célula originou uma colônia, a contagem do número total de viáveis na amostra pode ser feita considerando: 1. Número de colônias 2. Volume da gota 3. Fator de diluição. A mesma pipeta pode ser usada para todas as diluições, desde que o início seja a partir da maior diluição (Fig. 2.13.).

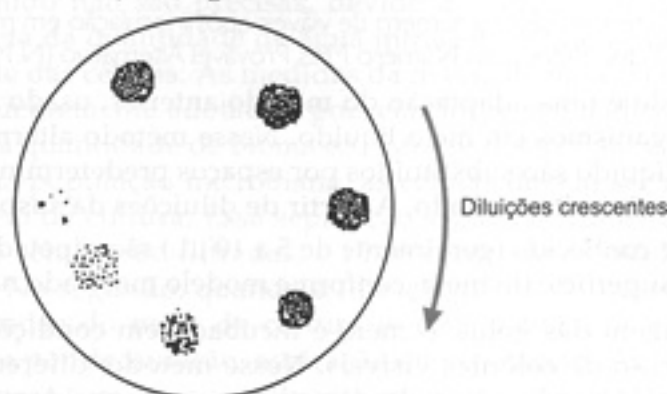


Figura 2.13 – Método da gota ou "Miles e Misra". As gotas provenientes de diluições menores apresentam crescimento, porém não apresentam colônias isoladas como as apresentadas nas gotas provenientes de diluições maiores.

2.8.2.4 – Contagem de colônias após filtração

Esse método é utilizado para amostras com uma baixa concentração de microrganismos. Por exemplo, a água de um rio limpo. Após passagem de determinado volume (100mL) por membranas filtrantes (Fig. 2.3.) com poros de 0,2 μ m de diâmetro, os filtros com os microrganismos retidos são colocados na superfície de meios de cultura sólidos apropriados e incubados em temperatura adequada. Durante a incubação, os nutrientes contidos no meio de cultura difundem através da membrana e, sobre ela, formam-se colônias a partir das células retidas no filtro. A contagem do número de células vivas é feita a partir das colônias crescidas na membrana e o volume da amostra filtrada.

2.8.2.5 – Determinação do número de viáveis após inoculação em meio líquido. Método do Número Mais Provável (N.M.P.)

Nesse método, a cultura ou suspensão contendo os microrganismos é diluída várias vezes, como nos métodos de semeadura em meio de cultura sólido. A seguir, inocula-se em uma série de 3, 5 ou 10 tubos um volume conhecido de cada diluição. Após a incubação, anota-se o número de tubos que apresentam turvação (crescimento) ou não para cada diluição inoculada. Os meios inoculados a partir de suspensões concentradas devem apresentar turvação em todos

os tubos. Os meios inoculados a partir de diluições maiores não apresentarão crescimento, ou seja, não estarão turvos. O método das diluições seriadas tem como princípio que os meios, que permanecem claros (sem crescimento visível a olho nu) mesmo após incubação, estão isentos de qualquer organismo vivo. Os tubos contendo meios inoculados com diluições intermediárias apresentarão turvação em apenas alguns tubos e em outros não. A proporção de tubos turvos e não turvos em cada diluição inoculada está relacionada com o número de organismos vivos na suspensão não diluída e é considerado o Número Mais Provável (N.M.P.) de organismos. O cálculo é obtido a partir dos resultados obtidos na prática recorrendo-se a tabelas adequadas^(1,3).

2.8.2.6 – Determinação do número de viáveis após inoculação em meio de cultura sólido. Método do Número Mais Provável Alternativo (N.M.P.A.).⁽²⁾

Esse método é uma adaptação do método anterior, usado para estimar o NMP de microrganismos em meio líquido. Nesse método alternativo os tubos contendo meio líquido são substituídos por espaços predeterminados na superfície de um meio de cultura sólido. A partir de diluições da suspensão original, gotas de volume conhecido (geralmente de 5 a 10 μ L) são pipetadas nos espaços delimitados na superfície do meio, conforme modelo mostrado na Fig. 2.14.

Após secagem das gotas, o meio é incubado em condições adequadas, até o aparecimento de colônias visíveis. Nesse método, diferente do método das gotas, as colônias não são contadas mas o que é considerado é o número de espaços inoculados a partir de cada diluição que apresente qualquer tipo de crescimento. A partir dos resultados, escolhe-se 3 diluições para o cálculo do número mais provável de microrganismos viáveis na amostra. Como no método anterior, O cálculo é obtido a partir dos resultados experimentais, recorrendo-se a tabelas adequadas.⁽¹⁾

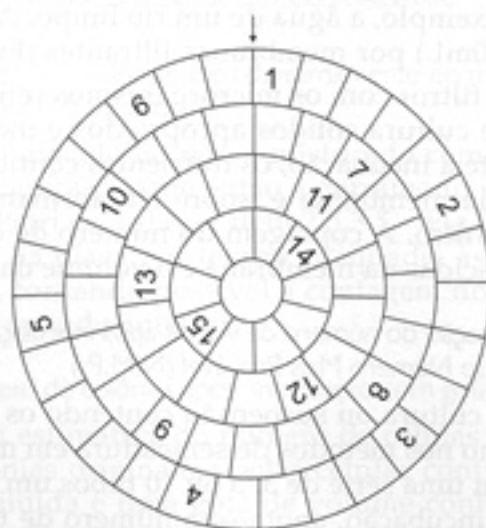


Figura 2.14 – Método do Número Mais Provável Alternativo (N.M.P.A.). Modelo utilizado para a inoculação do meio sólido. Os cinco espaços precedidos por números apontam os locais a serem inoculados a partir de cada diluição seriada.⁽¹⁾

Esse método não pode ser utilizado com organismos incapazes de crescer em meio sólido. Geralmente tem sido utilizado para bactérias e leveduras. O crescimento de colônias de forma não isolada em cada espaço, ao contrário dos outros métodos, não interfere no resultado da contagem.

2.8.3 – Métodos utilizados para medir a biomassa microbiana

2.8.3.1 – Determinação da massa de material celular

As células provenientes de uma cultura podem ser quantificadas por pesagem direta. Todavia, as estimativas obtidas com medidas da massa de material celular úmido não são precisas, devido às dificuldades encontradas na avaliação correta da quantidade de água intracelular, ou mesmo da água retida na superfície das células. As medidas da massa de matéria celular seca têm sido mais freqüentemente adotadas, pois elas fornecem dados mais precisos e proporcionais à quantidade de biomassa. Para se determinar a massa de matéria seca de uma população microbiana, as células devem ser inicialmente separadas do meio de cultura. Essa separação segue basicamente dois padrões: no primeiro as células são filtradas, o filtro contendo as células é lavado e a seguir secado. No segundo, quando a filtração não é utilizada, as células podem ser separadas do meio de cultura por centrifugação, removendo-se o meio de cultura por decantação, aspiração ou pipetagem. As células são lavadas e ressuspensas com água ou diluente adequado. A suspensão contendo as células é então colocada em cubetas previamente pesadas. Dependendo das características do material, a secagem pode ser realizada em forno a 105°C ou em temperaturas mais baixas (80 ou 40°C) em condições de vácuo. Dado o caráter higroscópico da maioria das células microbianas, antes de cada pesagem as cubetas devem ser esfriadas em dessecador à temperatura ambiente^(1,4). As medidas de massa do conteúdo celular seco têm sido bastante empregadas para avaliar crescimento de bactérias, leveduras e fungos filamentosos.

2.8.3.2 – Turbidimetria com espectrofotômetro

Ao longo dos últimos anos foram desenvolvidos muitos instrumentos para medir a turvação de uma suspensão contendo microrganismos.

Entre esses, o espectrofotômetro é um instrumento capaz de medir a quantidade de luz que é absorvida ou transmitida quando atravessa uma amostra contida em um recipiente. Muitas moléculas, biologicamente importantes, absorvem tipos específicos de energia de radiação (luz em diferentes comprimentos de onda). Em microbiologia, quando utilizamos o espectrofotômetro, um feixe de luz atravessa a suspensão que contém os microrganismos (geralmente bactérias ou leveduras). Quanto maior o número de microrganismos, maior será a dispersão da luz. O resultado será que uma menor quantidade de luz atravessará a amostra. A Fig. 2.12 apresenta um modelo simplificado de um espectrofotômetro. Normalmente as amostras são colocadas em tubos ou cubetas de tamanho e materiais apropriados. A maior parte

dos espectrofotômetros mede a quantidade de luz transmitida (transmitância) e a quantidade de luz absorvida (absorbância)⁽⁴⁾.

2.8.3.3 – Dosagem de componentes celulares

A dosagem de qualquer um dos principais componentes celulares pode fornecer uma avaliação da massa microbiana. Entre os componentes mais frequentemente dosados estão o *nitrogênio* e a *proteína* celulares. Para dosar o nitrogênio celular, um dos métodos mais utilizados tem sido o de Kjeldahl^(1,4). Nesse método o nitrogênio contido na matéria orgânica é convertido a sulfato de amônio por digestão com H_2SO_4 , na presença de um catalisador. Entre outros, o método colorimétrico de Lowry^(1,4) tem sido frequentemente utilizado para dosar o conteúdo protéico da biomassa microbiana. Muitas vezes a concentração de nitrogênio ou proteína não é proporcional ao conteúdo citoplasmático (por exemplo, quando uma fração considerável do nitrogênio celular forma uma estrutura particular da célula, como a cápsula de algumas espécies de *Bacillus* composta por ácido poliglutâmico). Nesses casos, outros componentes celulares podem ser dosados como o DNA ou o RNA^(1,4).

2.8.3.4 – Medidas de compostos resultantes da atividade metabólica

Quando as células estão em crescimento, a massa de material celular seco aumenta, enquanto a quantidade de nutrientes disponíveis no meio de cultura diminui. Essa é a razão pela qual, muitas vezes, para estimar a biomassa, recorremos a métodos que avaliam o desaparecimento do substrato no meio de cultura. Os métodos existentes para a dosagem dos diferentes substratos e, conseqüentemente, sua utilização pelos microrganismos, variam com o tipo de substrato a ser analisado. A análise de açúcares, por exemplo, é bastante simples, podendo ser feita por métodos colorimétricos^(1,4) ou por HPLC⁽⁵⁾ (Cromatografia líquida de alta pressão). O consumo de O_2 também pode ser usado como parâmetro para estimar a biomassa. Assim como o desaparecimento de substratos do meio de cultura, substâncias encontradas no meio, originadas da atividade metabólica dos microrganismos, podem ser dosadas e utilizadas como parâmetro proporcional à biomassa celular. Medidas da produção de CO_2 ou de ácidos orgânicos eliminados no meio de cultura são hoje facilmente obtidas com analisadores automatizados⁽⁵⁾.

2.8.3.5 – Volume de material celular após centrifugação

Esse método consiste na centrifugação de uma amostra de suspensão celular em tubo de centrífuga especialmente calibrado. A centrifugação deve ser realizada em condições que promovam o empacotamento dos microrganismos, sem provocar ruptura ou lise celular. O volume de células compactadas após a centrifugação é obtido por leitura na escala existente no próprio tubo. Os tubos calibrados são do tipo hematócitos, usados em rotina de laboratórios de hematologia. Esse método tem vantagens sobre o método da filtração, sobretudo quando a cultura apresenta problemas para ser filtrada⁽⁵⁾.

2.9 – Coloração de microrganismos

2.9.1 – Preparação de esfregaços e fixação pelo calor

Para que uma amostra seja corada, geralmente as células são previamente mortas e fixadas. Os esfregaços devem ser feitos sobre uma lâmina de vidro. Conforme esquema na Fig. 2.15, descreveremos a seqüência dos procedimentos a serem executados na preparação de um esfregaço: (a) Colocar sobre uma lâmina de vidro limpa e seca uma gota de água. (b) Emulsionar, na gota, os microrganismos aderidos na alça, provenientes de cultura em meio sólido. Se o inóculo for uma suspensão, não há necessidade de colocar previamente a gota de água. (c) e (d) Espalhar o inóculo na gota, de maneira a formar uma película fina sobre a lâmina. (e) Deixar secar em temperatura ambiente. Não secar diretamente na chama, para não modificar a morfologia dos microrganismos. (f) Fixar o material, passando rapidamente a lâmina 3 vezes sobre a chama do bico de Bunsen. Deixar esfriar antes da coloração.

Esse é o método mais simples para a preparação e fixação do esfregaço. Após coloração, ele poderá ser examinado em microscópio óptico.

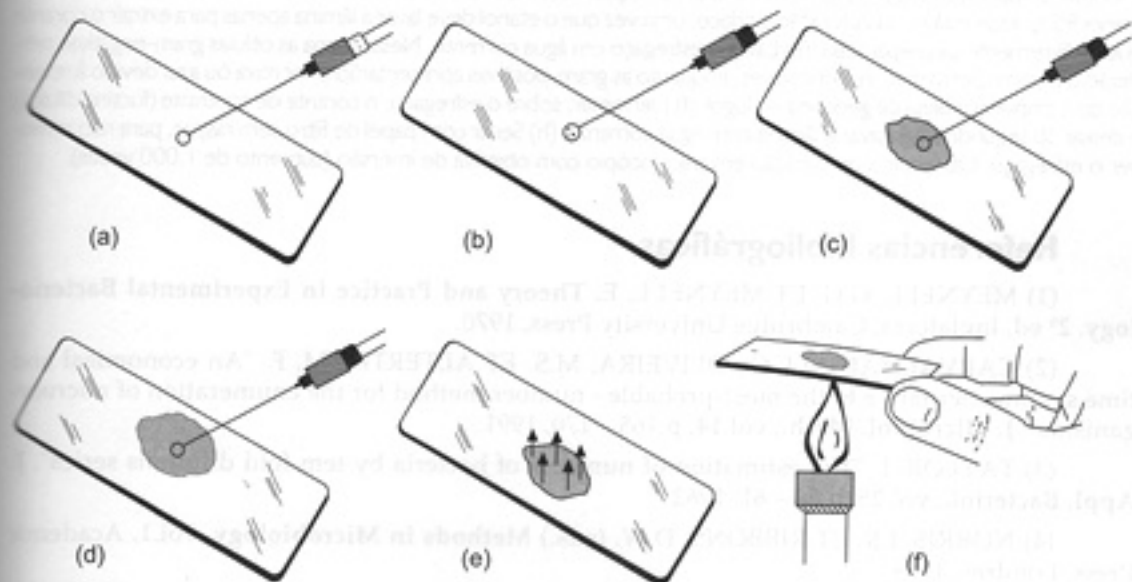


Figura 2.15 – Preparação de um esfregaço e sua fixação pelo calor.

2.9.2 – Coloração de Gram

Essa coloração é utilizada para separar as bactérias em dois grandes grupos: bactérias gram-positivas e bactérias gram-negativas. As etapas da coloração de gram encontram-se descritas na legenda da Fig. 2.16.

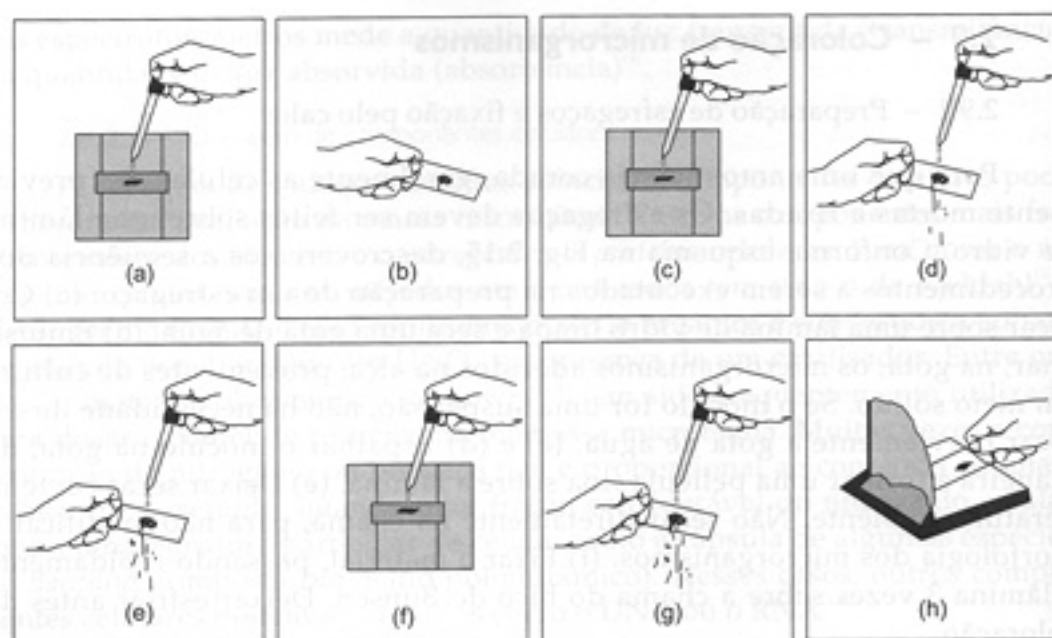


Figura 2.16 – Etapas da coloração de gram. (a) Sobre um esfregaço fixado derramar o corante violeta de genciana (deixar 1 minuto). (b) Escorrer a solução de violeta de genciana. (c) Cobrir a lâmina com uma solução aquosa de iodo e iodeto de potássio (Lugol). (d) Descolorar a preparação, vertendo lentamente sobre a lâmina um solvente como o etanol 95%. Esse estágio da coloração é crítico, uma vez que o etanol deve lavar a lâmina apenas para extrair o corante que sai livremente da preparação. (e) Lavar o esfregaço em água corrente. Nessa etapa as células gram-negativas perderão o corante permanecendo incolores, enquanto as gram-positivas apresentarão a cor roxa ou azul devido à retenção do complexo violeta de genciana — lugol. (f) Derramar, sobre o esfregaço, o corante de contraste (fucsina diluída) e deixar 30 segundos. (g) Lavar a lâmina com água corrente. (h) Secar com papel de filtro sem raspar, para não remover o esfregaço. Observar a preparação em microscópio com objetiva de imersão (aumento de 1.000 vezes).

Referências bibliográficas

- (1) MEYNELL, G.G. ET MEYNELL, E. *Theory and Practice in Experimental Bacteriology*. 2ª ed. Inglaterra, Cambridge University Press, 1970.
- (2) CARVALHAL, M.L.C.; OLIVEIRA, M.S. ET ALTERTHUM, F. "An economical and time saving alternative to the most-probable - number method for the enumeration of microorganisms". *J. Microbiol. Meth.*, vol.14, p.165 – 170, 1991.
- (3) TAYLOR, J. "The estimation of numbers of bacteria by ten fold dilutions series". *J. Appl. Bacteriol.*, vol.25, p.54 – 61, 1962.
- (4) NORRIS, J.R. ET RIBBONS, D.W. (eds.) *Methods in Microbiology*, vol.1, Academic Press, Londres, 1969.
- (5) GERHARDT, P. (EDITOR IN CHIEF); MURRAY, R.G.E.; COSTILOW, R. N.; NESTER, E.W.; WOOD, W.; KRIEG, N.R. ET PHILLIPS, G.B. *Manual of Methods for General Bacteriology*. American Society for Microbiology. Washington, 1981.

Leitura complementar

- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FAN, A.L. ET RANDAL, R.J. "Protein measurement with the Folin phenol reagent". *J.Biol. Chem.*, vol.193, p.265, 1951.

STUKUS, P.E. **Investigating Microbiology – A Laboratory Manual for General Microbiology**. Saunders College Publishing. EUA, 1997.

MILES, A.A. ET MISRA, S.S. "The estimation of the bactericidal power of the blood". *J. Hyg. Camb.*, vol.38, p. 732 – 742, 1938.

HOBEN, H.J. ET SOMASEGARAN, P. "Comparison of the pour, spread and drop plate methods for enumeration of *Rhizobium* spp". *Appl. Environ. Microbiol.* vol.44, p.1246 – 1247, 1982.

DE GENÉTICA DE MICRORGANISMOS

Prof. Dr. João de Azevedo

3.1 – Introdução

A Genética é uma das mais interessantes áreas da biologia. De uma maneira bem geral, pode-se dizer que a genética estuda as características de organismos para determinar como elas são herdadas. As heranças de hereditariedade são transmitidas de geração para geração. A Genética procura também explicar as causas da hereditariedade e o que pode ser observado entre a descendência e os pais.

Sendo o material genético, na grande maioria das vezes, constituído pelo ácido desoxirribonucleico, ou DNA, que obedece a certas regras definíveis tanto a plantas e animais como bactérias e vírus. É o DNA que contém as informações genéticas que determinam a constituição e sobrevivência das espécies. As leis fundamentais da hereditariedade foram descobertas pela primeira vez, na segunda metade do século XIX, pelo cientista Gregor Mendel, e com a redescoberta dessas leis em 1900, os princípios da genética tornaram-se amplamente usados em pesquisas genéticas. Desde então, a genética tem dado um novo impulso à ciência da hereditariedade. Os avanços recentes em técnicas foram extremamente importantes para a compreensão da hereditariedade em bactérias e vírus, além de algas e protozoários.

Essa introdução é um breve resumo para quem quiser saber mais sobre a genética, uma vez que microrganismos possuem qualidades que os tornam ideais para esse tipo de estudo. Eles apresentam, de modo geral, ciclos de vida curtos, permitindo o estudo da transmissão de características hereditárias em um período de tempo muito menor que o necessário para a maioria dos organismos multicelulares. Além disso, são facilmente cultivados em grande número, tornando possível a análise de populações, propiciando que características raras possam ser detectadas em grandes populações.

3

ELEMENTOS DE GENÉTICA DE MICRORGANISMOS

João Lúcio de Azevedo

3.1 – Introdução

A Genética é uma das mais recentes áreas das Ciências Biológicas que, de uma maneira bem geral, pode ser definida como o estudo da transmissão de características de ascendentes para descendentes. Essas características chamadas de hereditárias, são transmitidas de modo ordenado em todos os seres vivos. A Genética procura também explicar como ocorre a enorme variabilidade que pode ser observada entre e dentro das espécies.

Sendo o material genético, na grande maioria dos seres vivos, constituído pelo ácido desoxirribonucléico, ou DNA, a Genética possui suas regras aplicáveis tanto a plantas e animais superiores como aos microrganismos. É no DNA que estão as informações genéticas necessárias para a manutenção e sobrevivência das espécies. As leis fundamentais da Genética foram descritas pela primeira vez, na segunda metade do século passado, em ervilhas. Embora com a redescoberta dessas leis em 1900, e as plantas e animais serem amplamente usados em pesquisas genéticas, a introdução de microrganismos deu um novo impulso à ciência da hereditariedade. Foi apenas em 1941 que fungos foram efetivamente introduzidos em estudos genéticos, seguindo-se bactérias e vírus, além de algas e protozoários.

Essa introdução foi um marco decisivo para o desenvolvimento da Genética, uma vez que microrganismos possuem qualidades quase que ideais para esse tipo de estudo. Eles apresentam, de modo geral, um ciclo vital rápido, permitindo o estudo da transmissão de características hereditárias em curto período de tempo; sendo seres microscópicos, eles podem ser cultivados em grande número, requerendo pouco espaço e portanto com economia, propiciando que características raras possam ser detectadas em grandes populações;

sendo menos complexos que plantas e animais superiores em suas exigências nutricionais e de cultivo, eles tornam mais fácil a elucidação dos mecanismos da herança, principalmente em seus aspectos moleculares. Além disso, uma grande maioria dos microrganismos apresenta apenas um ou uma série única de cromossomos, que são as estruturas que contêm a maior parte do material genético, o DNA. Em outras palavras, os microrganismos são em geral haplóides, em contraposição a organismos superiores que, geralmente, possuem duas séries de cromossomos homólogos, ou seja, são diplóides. Em seres haplóides as características hereditárias manifestam-se de modo mais direto, não sendo mascaradas por outros genes homólogos. Foi devido a essas e outras vantagens que os microrganismos, especialmente a partir da segunda metade do século XX, foram empregados cada vez mais frequentemente em Genética. Além disso tudo, a utilização e importância cada vez maior desses seres microscópicos em processos industriais e de valor econômico nas áreas de saúde, agropecuária, energética, de alimentos e proteção ambiental, fez com que o interesse sobre a Genética e Melhoramento Genético de Microrganismos fosse incrementado. Como já mencionado, a investigação genética baseia-se na variabilidade existente entre e dentro das espécies.

Se todos indivíduos de uma mesma espécie fossem exatamente iguais, não haveria possibilidade de estudos genéticos. Essa variação tem como fonte a mutação, que consiste em modificações dos genes, ou seja, do material genético, que são transmitidos de pais para filhos. Entretanto, só o processo de mutação não explica toda a variabilidade encontrada nos seres vivos. Diferentes características hereditárias geradas pela mutação podem ser combinadas por meio de um segundo processo, o da recombinação. Esse é responsável pela junção de distintas características genéticas em um único indivíduo. Assim, mutação e recombinação constituem as molas mestras da variabilidade em todos os seres vivos, incluindo os microrganismos.

Na Genética microbiana são fundamentalmente estudados os mecanismos de mutação e recombinação que ocorrem nesses seres. Seu emprego permite também que a variabilidade existente possa ser direcionada para a obtenção de linhagens, raças, variedades ou estirpes microbianas melhoradas geneticamente. No presente capítulo a Genética microbiana, especialmente de fungos e bactérias vai ser abordada, primeiramente sob o ponto de vista de seus mutantes, sua obtenção, caracterização e usos. Em seguida os principais sistemas de recombinação genética serão apresentados. Finalmente outros aspectos genéticos de importância em microrganismos serão mencionados.

3.2 – Mutação

3.2.1 – Mutações espontâneas e induzidas. Agentes mutagênicos

Qualquer alteração no material genético que seja capaz de ser transmitida aos descendentes, constitui uma mutação. Existem vários tipos de mutações.

Alguns desses tipos são alterações grosseiras, causando perdas ou adições de grandes segmentos cromossômicos ou ainda inversões ou translocações do material genético. Outros tipos de mutações alteram o número de cromossomos. Finalmente um último tipo de mutação menos drástico é a mutação gênica ou de ponto. Nesse caso ocorrem substituições ou ainda adições ou perda de um ou poucos nucleotídeos no DNA. A Fig. 3.1 apresenta os diferentes tipos de mutações que ocorrem em seres vivos.

Qualquer que seja o tipo de mutação, esse é um evento raro, que acontece com diferentes frequências em diferentes genes, mas que pode ser considerado para cada gene como ocorrendo em média uma vez por um milhão de divisões celulares. As mutações ditas espontâneas são causadas por erros durante a duplicação do DNA, devido aos diferentes estados tautoméricos que existem nos nucleotídeos que formam os genes. Podem ser causadas também por agentes mutagênicos não controláveis, como raios cósmicos e outros como produtos químicos que entram em contacto com células vivas. A frequência de mutação espontânea pode ser aumentada em dezenas, centenas ou milhares de vezes, se forem propositadamente utilizados os chamados agentes mutagênicos. Nesse caso ocorrem mutações induzidas, que se somam às espontâneas. As radiações ionizantes como os raios gama, a luz ultravioleta, certos compostos químicos, incluindo os agentes alquilantes como o dietil-sulfato (DES), metanossulfonato de etila (EMS) e nitrosoguanidina (NTG), agentes desaminadores como o ácido nitroso (HNO_2) e hidroxilamina (HA), análogos de bases nitrogenadas como a 2-aminopurina (2-AP) e 5-bromo-deoxiuridina (5-BdU), ou ainda agentes intercalantes como os corantes de acridina, são todos mutagênicos. Eles são empregados pelos geneticistas e melhoristas para aumentar a variabilidade genética e proporcionar, assim, a escolha de mutantes apropriados. Revisões sobre mutação e agentes mutagênicos são numerosas e podem fornecer aos interessados mais detalhes sobre o assunto (1, 2, 3, 4). De qualquer modo, tanto mutantes espontâneos como induzidos ocorrem em geral ao acaso, de tal modo que o geneticista tem que recorrer ao uso de técnicas para selecionar os mutantes que a ele interessam. Recentemente técnicas especiais tem sido descritas para produzir mutantes com alterações definidas no material genético. Essas técnicas, conhecidas pela designação de "mutações sitiodirigidas", vêm permitindo transformar a indução de mutantes de um processo empírico em um processo dirigido, embora hajam ainda muitas limitações em seu uso. Técnicas de mutações sitiodirigidas fazem parte das tecnologias do DNA recombinante, conhecidas também como Engenharia Genética. Essas técnicas serão discutidas no capítulo 4 dessa publicação. No presente capítulo serão descritos os principais tipos de mutantes utilizados em microrganismos, seu isolamento e caracterização. Deve-se também ter em mente que, ao contrário de plantas e animais superiores, mutantes de microrganismos são visualizados não como um indivíduo mutante mas, em geral, como uma colônia crescendo em um determinado meio sólido. Utilizando-se sementeiras e diluições apropriadas, todas as células de uma colônia

A) Mutações ou alterações cromossômicas

1) Numéricas

Número de cromossomos

Haploidia	----	----	----	----
Diploidia	----	----	----	----
Triploidia	----	----	----	----
Tetraploidia	----	----	----	----
Dissomia	----	----	----	----
Trissomia	----	----	----	----
Dupla dissomia	----	----	----	----
Nulissomia	----	----	----	----

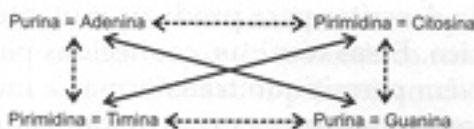
2) Estruturais

Estruturas dos cromossomos
(letras = regiões cromossômicas)

Fungo normal	a b c	d e f	g h i	j k l
Deficiência (terminal)	a b c	d e f	g h i	j k
Deficiência (intersticial)	a b c	d e f	g h i	j l
Duplicação (em tandem)	a b c	d e f	g h i	j k k l
Duplicação (não tandem)	a b c	d e f	g h i	j k i k
Inversão	a b c	d e f	g h i	k j l
Translocação (recíproca)	a b c	d e i	g h f	j k l

B) Mutações gênicas ou "de ponto"

3) Substituição de nucleotídeos



———— = Transição

----- = Transversão

4) Adições ou perdas de um ou poucos nucleotídeos

ATCGAATC ----- (Adição ou +) ----- ATTCGAATAC

ATCGAATC ----- (Perda ou -) ----- ATCGAATC

Figura 3.1 – Diferentes tipos de mutações nos seres vivos. Exemplos de mutações cromossômicas e gênicas.

microbiana constituem clones. Um clone é um conjunto de células ou indivíduos originados de uma única célula, por multiplicação vegetativa, sendo todas geneticamente iguais, portanto. Assim, a utilização de colônias ou clones em genética de microrganismos permite que macroscopicamente possam ser distinguidos mutantes, sem a necessidade do uso de microscópio, como será visto em seguida.

3.2.2 – Principais tipos de mutantes utilizados em genética de microrganismos

A lista de tipos de mutantes que podem ser utilizados é muito grande. Alguns são mais comumente empregados para certas espécies bacterianas, outros mais utilizados em fungos filamentosos e outros em leveduras, algas ou protozoários ou mesmo vírus. Tudo depende das características inerentes a cada espécie estudada e das finalidades da pesquisa. Entretanto, existem certos tipos de mutantes que são empregados com grande frequência, independentemente da espécie microbiana estudada. Eles serão descritos a seguir.

3.2.2.1 – Mutantes auxotróficos

Muitos microrganismos, especialmente bactérias e fungos, podem se desenvolver em um meio de cultivo sólido constituído apenas por sais minerais e uma fonte de carbono ou, ainda, com um ou poucos aminoácidos, vitaminas ou outros componentes de natureza conhecida adicionados ao meio. Esse é o meio de cultivo chamado de “definido” ou “mínimo” em oposição a meios ricos e complexos que possuem em sua composição peptona, caseína, extrato de leveduras, soluções de ácidos nucleicos, de vitaminas etc. Um meio desse tipo é chamado de “meio completo”. Uma espécie ou linhagem microbiana, que originalmente cresce tanto em meio mínimo como em meio completo, pode apresentar mutantes que só formam colônias em meio completo e não em meio mínimo. Tais mutantes são chamados de auxotróficos, em oposição à linhagem original ou selvagem que é chamada de prototrófica. Pode assim ser isolada uma grande variedade de mutantes auxotróficos, incapazes de crescer em meio mínimo. Esses mutantes perderam a capacidade de sintetizar algum componente do meio completo que não existe no meio mínimo.

O que ocorreu foi uma mutação em um gene que é necessário para a produção de um aminoácido, vitamina ou componente dos ácidos nucleicos. Assim, se ao meio mínimo for adicionado, por exemplo, a vitamina riboflavina, um mutante auxotrófico que perdeu a capacidade de produzir a vitamina, vai poder crescer novamente nesse meio mínimo com riboflavina. Como são vinte os aminoácidos essenciais, muitas as vitaminas e diversas as purinas e pirimidinas normalmente sintetizadas por um microrganismo prototrófico, pode-se compreender que o número de tipos de mutantes auxotróficos possíveis em uma única linhagem bacteriana ou de fungo é bastante grande. Existe uma nomenclatura toda especial para esses mutantes, que são designados

principalmente após as normas definidas em 1969 (5) por 3 letras, em geral as iniciais do componente que não pode ser sintetizado pelo mutante. Assim, um mutante que é incapaz de sintetizar riboflavina é chamado de *rib*, outro incapaz de sintetizar o aminoácido lisina é designado de *lys* e assim por diante. Como são vários genes envolvidos na síntese de um determinado componente essencial, às 3 letras pode-se seguir uma letra maiúscula que define o gene ou locus mutante (*lysA*, *lysB*, *lysC*, por exemplo). Se vários mutantes para um mesmo gene são conhecidos, eles ainda levam números após a letra (*lysA1*, *lysA2*, *lysA3* etc.).

3.2.2.2 – Mutantes que não utilizam certas fontes de carbono ou nitrogênio

De maneira semelhante aos mutantes auxotróficos para vitaminas, purinas, pirimidinas ou aminoácidos, há mutantes que não são capazes de crescer em meio mínimo no qual apenas uma determinada fonte de carbono ou nitrogênio foi adicionada. É comum em fungos e bactérias, por exemplo, a existência de mutantes incapazes de utilizar lactose como única fonte de carbono. Esses mutantes são chamados de lactose negativos (*lac*-). Outros não crescem se a galactose for a única fonte de carbono (mutantes *gal*-) e assim por diante. Mutantes há também que usam amônia ou nitrato como fonte de nitrogênio, mas são incapazes de usar nitrato. Todos esses mutantes são bastante usados em genética microbiana.

3.2.2.3 – Mutantes resistentes a agentes inibidores

Se uma população de células de linhagem microbiana é colocada em presença de um agente inibidor e sendo essa população originariamente sensível ao agente, somente mutantes resistentes poderão se multiplicar e formar colônias em presença do mesmo. Em bactérias, mutantes resistentes a antibióticos, quimioterápicos e sais de metais pesados são muito empregados. Mutantes resistentes ao antibiótico estreptomicina são representados por *strR*, os resistentes à ampicilina são chamados de *ampR* e assim por diante. Em fungos, mutantes resistentes a corantes, fungicidas e outros agentes são também bastante empregados em genética. Inibidores não são apenas antibióticos, fungicidas ou outras drogas químicas. Agentes físicos e biológicos também impedem o crescimento de microrganismos e pode ocorrer resistência aos mesmos. É o caso de mutantes resistentes à luz ultravioleta, altas temperaturas, vírus, etc.

3.2.2.4 – Mutantes morfológicos

São aqueles que apresentam modificações na coloração, tamanho ou formato da colônia, em comparação com o tipo original ou selvagem. Em bactérias e fungos eles são comuns, como no caso de mutantes albinos. Também muito empregados são os mutantes com tamanho de colônia menor que o normal, como os "petite" de leveduras ou compactos de fungos filamentosos que, em geral, apresentam deficiências respiratórias. Mutantes com bordos de colônias

alterados são freqüentemente empregados, como os mutantes rugosos de bactérias, em oposição ao tipo liso capsulado. Em fungos, onde existe uma maior complexidade de estruturas distintas como conídios e corpos de frutificação, mutantes morfológicos são mais freqüentemente encontrados, como por exemplo os aconidiais ou os que apresentam alterações em estruturas reprodutivas.

3.2.2.5 – Mutantes para produção de substâncias liberadas pelas células

Em bactérias e fungos, muitos produtos são liberados pelas células no meio de cultivo. Bactérias do gênero *Bacillus*, *Streptomyces* e fungos como o *Penicillium*, liberam antibióticos de importância econômica. Outros liberam ácidos orgânicos, vitaminas, enzimas e muitos outros produtos de grande valor biotecnológico. Assim, a busca e o isolamento de mutantes com maior produção de antibióticos, vitaminas, enzimas e outros produtos faz parte de programas de melhoramento genético. Foi por meio do uso desses mutantes que se conseguiram aumentos consideráveis na produção do antibiótico penicilina por *Penicillium chrysogenum*. Também em certos casos é importante a obtenção de mutantes com diminuição ou mesmo perda de produtos indesejáveis. Com a finalidade de estudos básicos, a obtenção de mutantes incapazes de produzir substâncias de valor econômico pode lançar novas luzes sobre os mecanismos de produção, regulação e liberação das mesmas pelas células.

3.2.2.6 – Mutantes para virulência e patogenicidade

Muitos microrganismos causam doenças em seres humanos, animais e plantas, inclusive atacando outros microrganismos. Mutantes com eficiências variáveis ou mesmo incapazes de causar doenças podem ser obtidos. Essas alterações estão ligadas em geral à produção de antígenos específicos, toxinas, capacidade de aderência aos tecidos etc. No controle biológico de insetos-pragas por exemplo, procura-se obter microrganismos cada vez mais eficientes em causar morte de seus hospedeiros.

3.2.2.7 – Mutantes mais sensíveis a agentes inibidores

Assim como existem mutantes resistentes, o inverso também é verdadeiro. Se um microrganismo desenvolve-se bem entre 28°C e 37°C, podem ser conseguidos mutantes que são sensíveis à temperatura, isto é, só podem crescer até 25°C, sendo inibidos por temperaturas mais elevadas. Esses mutantes em geral estão relacionados com os auxotróficos já citados. Nesse caso pode ocorrer mutação em um gene que produz uma enzima termolábil, que em temperaturas mais elevadas não funciona, impedindo assim a síntese de um produto essencial para o desenvolvimento do microrganismo. Em temperaturas mais baixas, entretanto, ela pode atuar e o microrganismo desenvolve-se normalmente. Mutantes mais sensíveis à luz ultravioleta são bastante comuns. Por meio deles foram descobertos os principais mecanismos genéticos de reparo que as células possuem para evitar os efeitos danosos da luz ultravioleta solar.

3.2.2.8 – Reversões

Assim como um microrganismo pode mutar para auxotrofia, resistência a antibióticos, características morfológicas e outras, ele pode também sofrer reversão dessa mutação, voltando ao tipo normal ou selvagem. Essa mutação reversa ou reversão é chamada de verdadeira, quando repara exatamente o defeito causado pela primeira mutação. Ela pode ser também supressora quando ocorre em outro local do genoma, podendo ser no mesmo gene onde estava localizada a primeira mutação, mas não no mesmo local da primeira alteração (reversão intragênica) ou em outro gene (reversão intergênica). A reversão, especialmente a volta da auxotrofia para a prototrofia, é muito empregada para a detecção e determinação da eficiência de um agente mutagênico. Pelo número de reversões obtidas após o tratamento com um suposto agente mutagênico, em comparação com um controle, pode-se concluir se ele é realmente mutagênico, e nesse caso, sua eficácia em causar mutações pode ser estimada (para maiores detalhes consultar 1, 2, 4).

3.2.2.9 – Outros tipos de mutantes

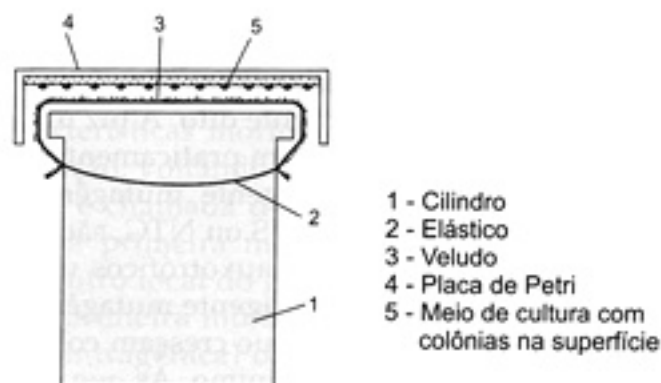
A lista dos tipos de mutantes empregados em genética microbiana é praticamente infindável. Embora os principais já tenham sido mencionados, pode-se acrescentar a essa lista os mutantes que apresentam alterações na locomoção em microrganismos que apresentam flagelos e outros meios de motilidade. Outros mutantes têm comportamento alterado, ou seja, apresentam quimiotaxia, fototaxia ou outros tipos de atração ou repulsão por agentes químicos ou físicos que os distinguem do tipo normal ou selvagem. Mutantes com locomoção ou comportamento alterado são comumente usados em bactérias e em protozoários. Mutantes com alteração na síntese de DNA, na síntese e mecanismos de ação dos diferentes tipos de RNAs das células, mutantes para alterações em características de valor comercial, como por exemplo fixação de nitrogênio em bactérias e muitos outros têm sido empregados com finalidades acadêmicas ou aplicadas. Também nos vírus, protozoários e algas, há outros tipos de mutantes empregados. Em algas clorofiladas, por exemplo, mutantes para fotossíntese são conhecidos. Para vírus existe uma gama de mutantes estudados em seus hospedeiros específicos. Pela constatação da existência de muitos tipos de mutantes em microrganismos, fica claro que eles apresentam variabilidade genética não só entre espécies mas entre linhagens. A existência dessa variabilidade possibilitou um maior conhecimento da Genética Microbiana e permitiu um maior desenvolvimento da Genética como um todo.

3.2.3 – Isolamento e caracterização de mutantes microbianos

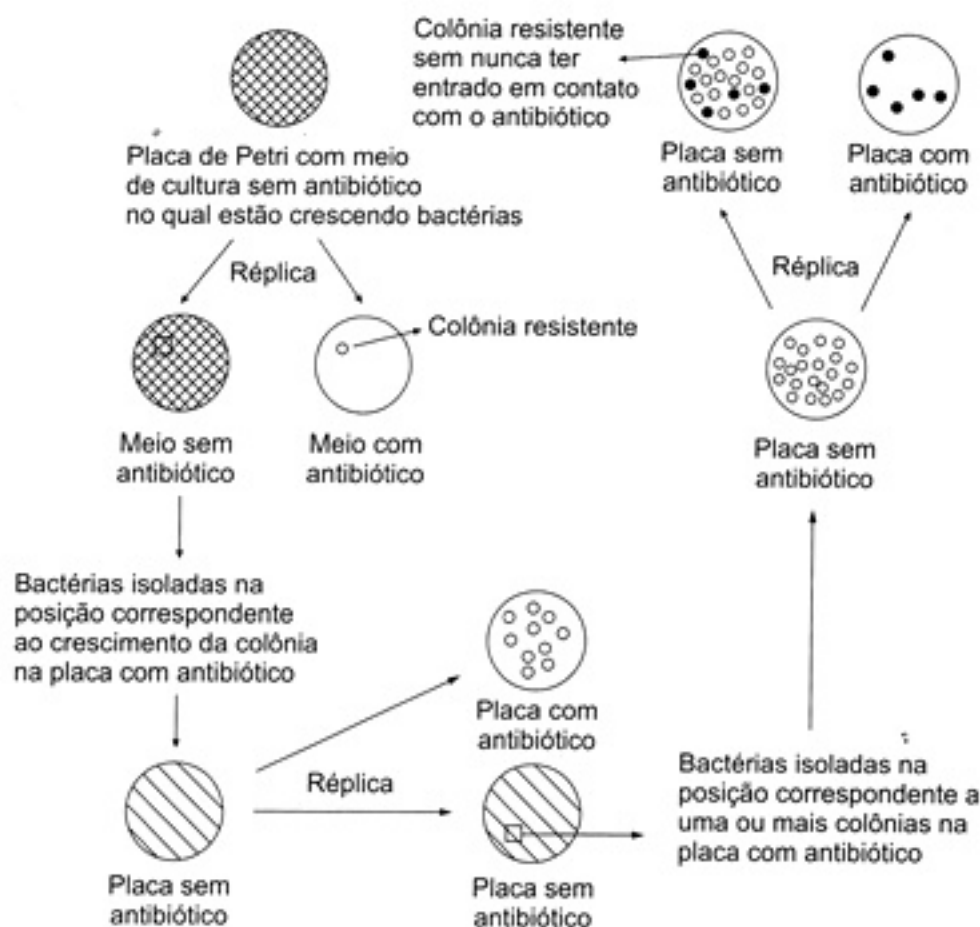
Os mutantes são os instrumentos que o geneticista tem em mãos para realizar pesquisas sobre a hereditariedade. Não é portanto por acaso que foram e continuam a ser desenvolvidos métodos rápidos e eficazes no isolamento de mutantes. Esses métodos são bastante diversos, dependendo do tipo de mu-

tante que se quer isolar e do microrganismo utilizado. Em geral, para se conseguir uma maior frequência de mutantes, empregam-se agentes mutagênicos antes de se iniciar o isolamento propriamente dito. A luz ultravioleta, pela sua facilidade de utilização e disponibilidade em praticamente qualquer laboratório de Microbiologia ou Genética, é o agente mutagênico mais utilizado. Entretanto outros mutagênicos, como o EMS ou NTG, são também muito empregados. Para o isolamento de mutantes auxotróficos um processo óbvio é tratar uma população microbiana com um agente mutagênico, em seguida semente células em um meio completo para que cresçam colônias isoladas e depois transferi-las, uma a uma, para meio mínimo. As que não crescerem nesse meio serão auxotróficas. Essa transferência pode ser feita de uma só vez, utilizando-se um veludo que funciona como um carimbo (6). Tendo sido desenvolvida para bactérias, leveduras e, com algumas modificações, para fungos filamentosos (Fig. 3.2), ainda assim o processo é trabalhoso.

Métodos foram então criados para selecionar mutantes auxotróficos antes da semente das células em meio completo. Um deles, usado para bactérias sensíveis à penicilina, consiste em colocar a população após tratamento com mutagênico em meio mínimo líquido, contendo esse antibiótico, por um certo período de tempo. Nesse meio as células prototróficas irão multiplicar-se e, nesse momento, serão mortas pelo antibiótico. As auxotróficas não se dividem no meio mínimo e são preservadas. Uma centrifugação é então realizada para precipitar as células. O sobrenadante contendo o antibiótico é então retirado e as células são ressuspensas em solução salina e semeadas em meio completo. Uma porção razoável dessas células darão origem a colônias auxotróficas, como poderá ser constatado por transferência das mesmas para meio mínimo. Em fungos as técnicas de enriquecimento de auxotróficos são feitas também em meio mínimo líquido, onde conídios, que são formas de resistência, sobrevivem a altas temperaturas ou em presença de certos produtos químicos. Como auxotróficos não germinam nesse meio, eles são preservados, enquanto os prototróficos irão morrer quando submetidos a temperaturas altas ou a determinados produtos. Também filtração pode separar células sem germinar das germinadas, permitindo um enriquecimento de mutantes na população que passou pelo filtro (7). A caracterização de mutantes auxotróficos pode ser feita adicionando-se ao meio mínimo fontes de vitaminas, aminoácidos e componentes dos ácidos nucleicos. De acordo com o crescimento ou não nesses meios, o mutante é caracterizado para sua deficiência nutricional. Mais detalhes sobre o isolamento e caracterização de mutantes auxotróficos podem ser encontrados em revisões e manuais sobre o assunto (8, 9, 10, 11, 12, 13). O isolamento de mutantes resistentes a agentes inibidores é, em geral, bastante simplificado, pois basta colocar a população sensível ao inibidor em presença de concentrações apropriadas do mesmo. Evidentemente, só mutantes resistentes poderão se desenvolver e formar colônias nesse meio. É assim que mutantes resistentes a antibióticos, fungicidas e outros produtos que impedem o crescimento de microrganismos podem ser isolados. Um processo alternativo



(A)



(B)

Figura 3.2 - A técnica da réplica para transferência de bactérias. A) A transferência de colônias da placa para o veludo. B) Aplicação da técnica no isolamento de bactérias resistentes a um antibiótico mostrando, inclusive, que a mutação para resistência ocorre previamente ao contato com a droga.

é usado em casos com resistência poligênica, isto é, quando vários genes estão envolvidos, cada um conferindo uma pequena resistência. Nesses casos, utiliza-se a placa gradiente (Fig. 3.3), que faz com que um meio de cultura apresente um gradiente de concentrações de zero até um limite máximo.

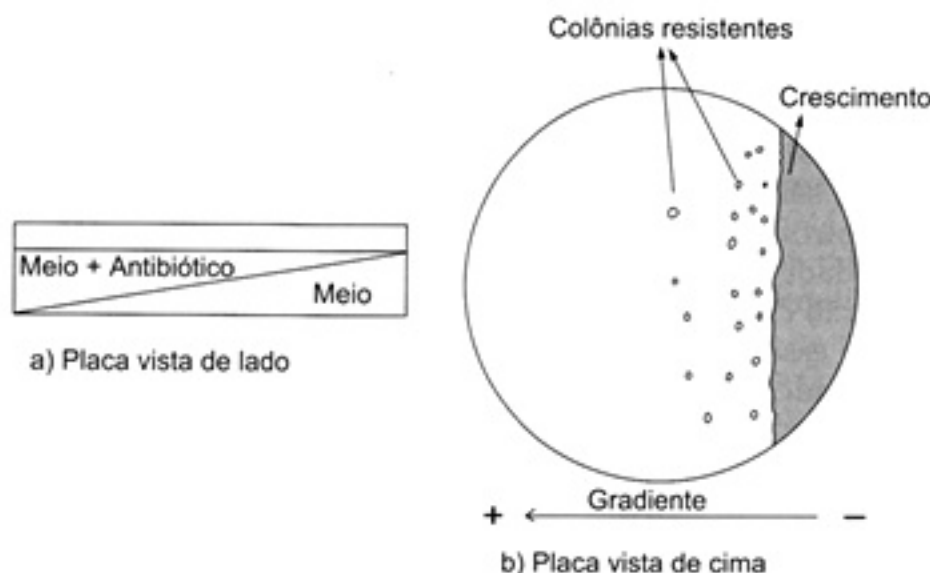


Figura 3.3 – Placa gradiente para o isolamento de mutantes resistentes a certos antibióticos.

Dessa maneira linhagens com genes cromossômicos para alta resistência a penicilinas, cloranfenicol, tetraciclina e outros antibióticos puderam ser isoladas (para uma revisão ver 14). O isolamento de mutantes morfológicos é feito por inspeção visual, não existindo praticamente uma maneira de se fazer um enriquecimento prévio. O importante no caso é ter em mente que alterações do ambiente podem também alterar a morfologia de colônias microbianas. Assim, o isolamento tem que ser feito em condições bem controladas. Há necessidade de vários repiques de colônias com morfologia alterada para verificar se a característica é realmente genética e não devido a modificações no ambiente.

Mutantes para maior ou menor produção de substâncias eliminadas das células microbianas, para o meio de cultivo, são também isolados em meios que permitam essa distinção. Para o isolamento de mutantes com produção alterada de um antibiótico, por exemplo, colônias podem ser desenvolvidas em meio sólido e depois colocadas em presença de um microrganismo sensível. Evidentemente esse microrganismo não poderá crescer ao redor de colônias produtoras e quanto maior o halo de inibição formado ao redor da colônia, maior deve ter sido a produção de antibiótico pela mesma. De igual forma, o isolamento de um microrganismo com mais alta ou mais baixa produção de uma enzima do que a linhagem original, pode ser feita em meio apropriado. Para amilases pode-se usar meio com amido e verificar a presença de halos e seu diâmetro, usando-se uma solução de iodo que vai colorir de

azul as regiões do meio com amido e permitir o aparecimento de halo claro ao redor de colônias que produziram amilase. Processos semelhantes são feitos para o isolamento de mutantes com produção alterada de celulasas, lipases, quitinases e muitas outras enzimas e produtos. Embora o método seja semi-quantitativo, ele permite uma seleção das colônias mais promissoras, que deverão então ser submetidas a ensaios mais acurados. Foi por meio dessa metodologia que linhagens mutantes de valor industrial foram obtidas para a produção de antibióticos, enzimas, ácidos orgânicos, entre outros. Mutantes para locomoção alterada são isolados em meios semi-sólidos; mutantes para patogenicidade são isolados em presença de seus hospedeiros; reversões de mutantes auxotróficos para prototróficos podem ser isolados semeando-se grande quantidade de células em meio mínimo, onde só células com mutações reversas poderão crescer. Enfim, os processos para o isolamento de mutantes são variados e essa é uma área bastante criativa, e sempre em expansão dentro da genética microbiana.

3.2.4 – A natureza da variação microbiana

Seja qual for o tipo de mutante a ser isolado e a finalidade para o qual ele vai ser utilizado, deve-se sempre ter em mente que a mutação ocorre ao acaso, não sendo induzida de maneira dirigida, seja pelo agente mutagênico utilizado, seja pelo agente selecionador. É certo que determinados agentes mutagênicos podem, de maneira muito limitada, favorecer o isolamento de alguns mutantes quando se tem idéia da composição de bases nitrogenadas no gene ou genes a serem mutados. Se o gene for rico em guanina e citosina, por exemplo, o uso de mutagênico cujo modo de ação é preferencial para essas bases, pode levar a uma maior facilidade no isolamento de mutantes nesses genes. Também fica evidente que a nova tecnologia do DNA recombinante, principalmente a mutação sitiodirigida, a síntese de genes e a introdução de segmentos específicos de DNA, produzem células microbianas com características genéticas determinadas.

É interessante salientar também que, embora muitas vezes fique a impressão de que os microrganismos sejam induzidos a mutar em presença de um inibidor, como um antibiótico por exemplo, a maioria dos experimentos demonstra que o agente inibidor apenas seleciona mutantes resistentes que ocorreram antes do contato com o mesmo. Vários trabalhos (6,15,16) demonstram que não ocorre uma adaptação tipo lamarquista do microrganismo ao agente inibidor, mas sim um sistema de mutação ao acaso, seguida de seleção pelo agente em questão.

3.3 – Recombinação em microrganismos

Existindo mutantes apropriados em diferentes células ou indivíduos, eles podem ser combinados de distintas maneiras nos descendentes. O mecanismo que permite com que essas combinações sejam produzidas é o de

recombinação. A recombinação é praticamente essencial para que uma espécie possa existir como tal e produzir descendentes que sejam capazes de sobreviver às variações do ambiente. Dessa maneira diferentes mecanismos de recombinação existem em microrganismos e mesmo dentro de uma mesma espécie podem ocorrer duas ou mais formas de recombinação. Mecanismos sexuais de recombinação são conhecidos há algum tempo em microrganismos eucarióticos, isto é, com núcleo típico, como os fungos, algas e protozoários. Entretanto, mesmo nesses microrganismos outros sistemas de recombinação começaram a ser descritos a partir dos anos 50 do século passado. Em bactérias tanto o mecanismo sexual de recombinação como processos alternativos de recombinação só começaram a ser descobertos a partir de 1944, ou seja, aproximadamente 60 anos atrás. Os sistemas de recombinação em microrganismos e suas potencialidades para a Genética e Melhoramento Genético serão a seguir descritos.

3.3.1 – Recombinação em bactérias

Um dos fatores responsáveis pela introdução das bactérias em estudos genéticos, somente a partir dos anos 40 do século XX, foi o desconhecimento dos mecanismos de recombinação ou troca de material genético entre esses microrganismos. Foi em 1944 que Avery e colaboradores (17) mostraram que um processo não formal de recombinação ocorria em bactérias, a transformação bacteriana. Dois anos mais tarde, Lederberg e Tatum (18) demonstraram pela primeira vez a existência de um processo sexual em bactérias, designado de conjugação bacteriana. Em 1952, Zinder e Lederberg (19) demonstraram a existência de um terceiro processo de recombinação em bactérias, chamado por eles de transdução. Todos esses processos, embora evidenciados a partir de linhagens mutantes em laboratório, devem também ocorrer com certa frequência na natureza e é por meio deles que as bactérias podem trocar material genético, surgindo assim linhagens com novas combinações de genes. Além desses processos, que podem ser considerados de certa forma naturais, mais recentemente foram descritos mecanismos de recombinação por meio de manipulação do DNA em laboratório. Essas novas tecnologias permitem troca de material genético entre espécies e gêneros bacterianos diferentes, como também propiciam a introdução de características genéticas de outros reinos, como de plantas e animais superiores em bactérias e vice-versa.

3.3.1.1 – A conjugação bacteriana

O primeiro experimento que revelou a existência de um mecanismo sexual de recombinação em bactérias foi feito em *Escherichia coli*. Duas linhagens com deficiências nutricionais, ou seja, mutantes auxotróficos, foram misturadas em um mesmo tubo de ensaio e desta mistura surgiram recombinantes que cresceram em um meio mínimo, sem os requisitos nutricionais necessários para o desenvolvimento das linhagens originais. A frequência de células recombinantes era bem maior que a esperada, se somente mutação reversa de auxotrofia para prototrofia estivesse ocorrendo. Um experimento conhecido

como do tubo em U, mostrou que havia necessidade de um íntimo contato entre as células das duas linhagens originais para que recombinantes prototróficos aparecessem (Fig. 3.4).

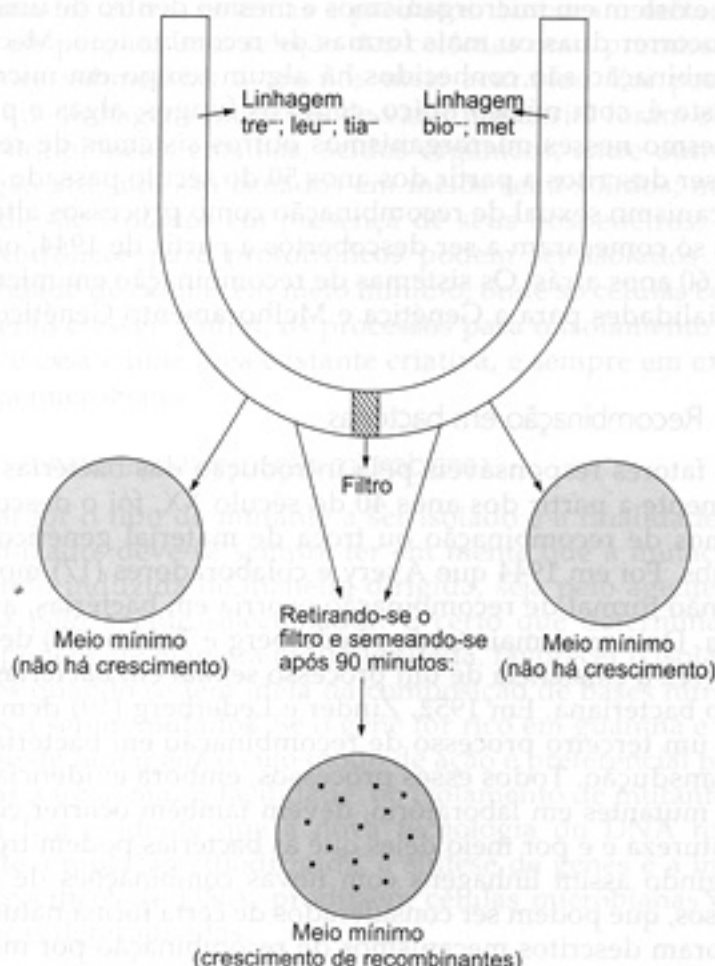


Figura 3.4 – Demonstração da recombinação em bactérias por conjugação com mutantes auxotróficos deficientes para a síntese de Treonina (tre^-), Leucina (leu^-), Tiamina (tia^-), Biotina (bio^-) e Metionina (met^-), utilizando-se um tubo em U.

O próximo passo foi demonstrar que existiam tipos de reações sexuais ou "sexos" diferentes em bactérias. Hayes em 1952 (20) realizou cruzamentos recíprocos, empregando duas linhagens com deficiências nutricionais distintas e uma delas sendo resistente ao antibiótico estreptomicina. Foi verificado que recombinantes só apareciam em meio com estreptomicina quando uma linhagem determinada era resistente a esse antibiótico. Isso levou à conclusão de que haviam células doadoras de material genético e células receptoras desse material que necessitavam permanecer vivas no meio com estreptomicina, para que a conjugação produzisse recombinantes. As células doadoras foram chamadas de F^+ ou "masculinas" e as receptoras, de F^- ou "femininas". Aos

poucos o processo foi sendo elucidado. Verificou-se logo a seguir que células doadoras eram diferentes das receptoras, por conter além do cromossomo um elemento extracromossômico adicional, designado de plasmídeo F (de fertilidade). Por outro lado, células receptoras não continham o plasmídeo F. Mais tarde foi também visto que o plasmídeo F, possivelmente de origem viral, possuía tamanho bem menor que o cromossomo bacteriano, mas era capaz de conter genes suficientes para sua duplicação autônoma, isto é, independente da do cromossomo da célula, além de possuir genes para sua transferência de uma célula para outra. Entre esses genes existiam aqueles carregando informações genéticas para a síntese de fímbrias ou pilli sexuais, que permitiam com que o contato entre células doadoras e receptoras ocorresse e que o material genético passasse de uma célula para outra. Foi verificado, também, que pela conjugação bacteriana apenas o plasmídeo F pode ser transferido após sua duplicação na célula doadora (Fig. 3.5).

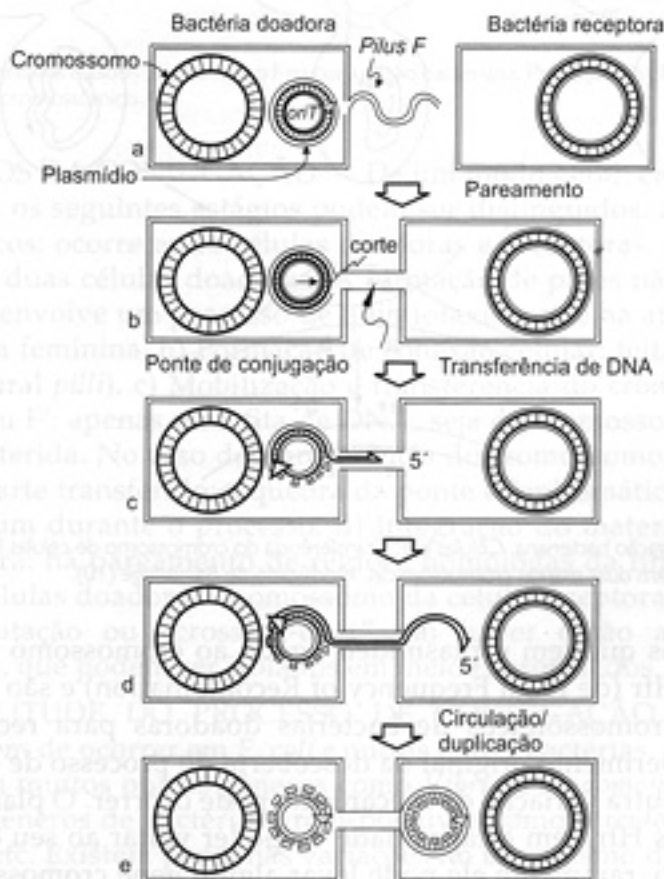


Figura 3.5 – Conjugação em bactérias. Transferência do plasmídeo F. a) junção da célula doadora (F+) com a célula receptora (F-), a primeira contendo cromossomo e plasmídeo com ponto de origem (*oriT*), e a segunda só com o cromossomo. b) Formação de ponte de conjugação e corte em um dos fios do DNA do plasmídeo F, no ponto *oriT*. c) transferência de um dos fios do DNA do plasmídeo da célula doadora para a receptora. d) Síntese de cadeias complementares do DNA no plasmídeo. e) Término da conjugação resultando duas células F+ (modificado de Souza ⁽²¹⁾).

Nesse caso, a célula receptora feminina não recebe genes cromossômicos, mas apenas muda de sexo. Por outro lado, a célula doadora pode também mudar de seu estado F+ para F-, se perder o plasmídeo. Isso ocorre quando ele se duplica mais lentamente que a célula que o alberga, ou quando a bactéria é tratada por certos agentes como corantes de acridina. Esses corantes são chamados de "curagênicos", pois o processo de perda de plasmídeo é designado de "cura". Mas nem sempre pela conjugação bacteriana só passa o plasmídeo F de uma célula para outra. Esse plasmídeo tem a propriedade de poder inserir-se no cromossomo da célula doadora. Nesse caso, ele pode transferir parte do cromossomo ou todo o cromossomo para a célula receptora (Fig. 3.6).

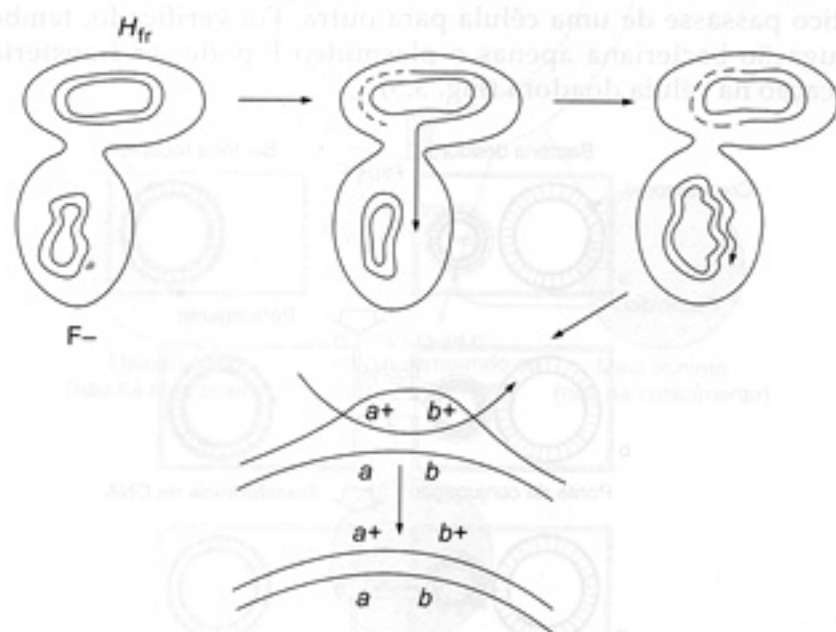


Figura 3.6 – Conjugação bacteriana. Células Hfr. Transferência do cromossomo de células Hfr para células F-. Os genes *a* e *b* representam duas marcas cromossômicas. Modificado de Bainbridge (10).

As células que tem o plasmídeo ligado ao cromossomo bacteriano são chamadas de Hfr (de High Frequency of Recombination) e são elas que transferem genes cromossômicos de bactérias doadoras para receptoras, como ocorreu no experimento original da descoberta do processo de conjugação em *E. coli*. Ainda outra variação do mecanismo pode ocorrer. O plasmídeo F, inserido em células Hfr, tem a capacidade de poder voltar ao seu estado autônomo. Nesse caso, raramente ele pode levar algum gene cromossômico quando se desliga do mesmo. Plasmídeos carregando um ou mais genes do cromossomo são chamados de F' (F linha ou F- primo). Quando eles passam de uma célula para outra, carregam gene ou genes cromossômicos para a bactéria receptora. Esse processo é chamado de sexodução (Fig. 3.7).

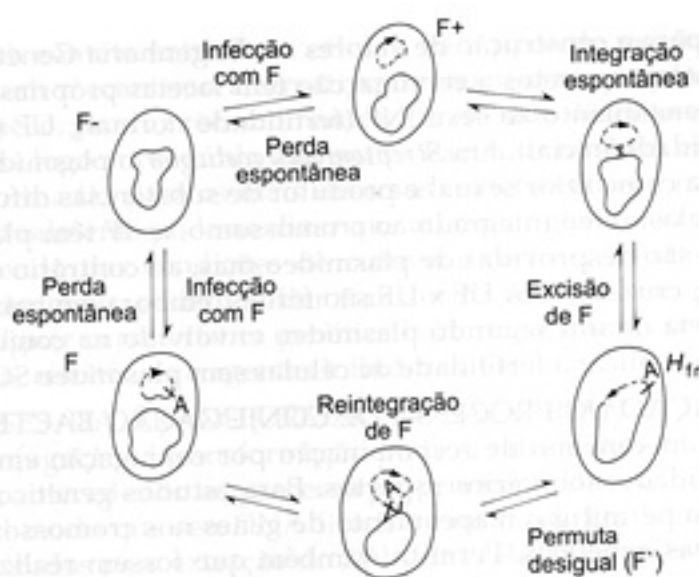


Figura 3.7 – Os diferentes estados do plasmídeo F na conjugação bacteriana. Produção de plasmídeos F' com transferência de um gene cromossômico A.

ESTÁGIOS DA CONJUGAÇÃO – De um modo geral, em uma conjugação bacteriana os seguintes estágios podem ser distinguidos. a) Formação de pares específicos: ocorre entre células doadoras e receptoras, mas raramente também entre duas células doadoras. A formação de pares não é exatamente ao acaso, mas envolve um processo de quimiotaxia, onde há atração da célula masculina pela feminina. b) Formação de conexão celular: feita através do *pilus sexual* (plural *pilli*). c) Mobilização e transferência do cromossomo ou do plasmídeo F ou F': apenas uma fita de DNA, seja do cromossomo ou do plasmídeo, é transferida. No caso de transferência do cromossomo ele quase sempre só é em parte transferido; a quebra da ponte citoplasmática entre as duas células é comum durante o processo. d) Integração do material genético na célula receptora: há pareamento de regiões homólogas da fita de DNA proveniente da células doadora e cromossomo da célula receptora. Pelo mecanismo de permutação ou "crossing-over" vai haver então a formação de recombinantes, que podem ser isolados em meios apropriados.

A AMPLITUDE DO PROCESSO DE CONJUGAÇÃO ENTRE BACTÉRIAS – Além de ocorrer em *E. coli* e outras enterobactérias, a conjugação já foi descrita em muitos outros gêneros como *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* e inclusive em gêneros de bactérias gram-positivas como *Streptomyces*, *Bacillus*, *Streptococcus*, etc. Existem pequenas variações no mecanismo de acordo com a espécie, mas as características gerais da conjugação permanecem as mesmas. Cruzamentos interespecíficos são às vezes possíveis entre gêneros aparentados, como *Escherichia* e *Shigella*. *Pseudomonas* possuem plasmídeos designados de P. Alguns deles são ditos plasmídeos promíscuos, pois podem ser transferidos para gêneros bastante distintos. A descoberta dos plasmídeos P foi de

grande valor para a construção de vetores em Engenharia Genética (Ver Capítulo 4). Em estreptomicetos a conjugação tem facetas próprias. Existem 3 tipos de linhagens quanto ao sexo: NF (fertilidade normal), UF (ultrafertilidade) e IF (fertilidade inicial). Em *Streptomyces coelicolor* o plasmídeo é chamado de SCP1 e atua como fator sexual e produtor de substâncias difusíveis. Linhagens NF têm plasmídeo integrado ao cromossomo, as IF têm plasmídeo autônomo e as UF são desprovidas de plasmídeo mas, ao contrário do que ocorre em *Escherichia*, cruzamentos UF x UF são férteis, embora em baixas frequências. A descoberta de um segundo plasmídeo envolvido na conjugação dessas bactérias pode explicar a fertilidade de células sem plasmídeo SCP1.

UTILIZAÇÃO DO PROCESSO DE CONJUGAÇÃO BACTERIANA – A descoberta do mecanismo de recombinação por conjugação em bactérias foi de grande utilidade, sob vários aspectos. Para estudos genéticos de espécies bacterianas, ela permitiu o mapeamento de genes nos cromossomos e a construção de mapas genéticos. Permitiu também que fossem realizados estudos sobre dominância e recessividade de genes em células haplóides, pela construção de zigotos parciais ou merozigotos com genes homólogos na mesma célula. Foi assim possível o estudo de complementação entre genes mutantes. Mais importante ainda, ela abriu caminho para que a regulação gênica, principalmente em bactérias e depois em outros seres vivos, fosse compreendida (22). Pode-se mesmo dizer que a conjugação bacteriana foi imprescindível para o notável desenvolvimento da Biologia Molecular e da Engenharia Genética nas últimas décadas. Finalmente ela permitiu, em espécies de valor econômico, que se fizesse um melhoramento genético agrupando genes de interesse, em linhagens de importância agrícola ou industrial.

3.3.1.2 – Transformação em bactérias

O mecanismo de transformação foi o primeiro a ser evidenciado como causando recombinação em bactérias, antes mesmo do processo de conjugação acima descrito. Ele foi observado pela primeira vez na Inglaterra. Griffith, em 1928 (23), injetou em camundongos uma mistura de duas linhagens da bactéria então chamada *Diplococcus pneumoniae* ou *Pneumococcus*, hoje conhecida como *Streptococcus pneumoniae*. Uma das linhagens usadas era virulenta, mas tinha sido morta por aquecimento. A outra era viva e avirulenta. Os camundongos injetados com a mistura morreram e deles foram isoladas bactérias virulentas. O fenômeno foi chamado de transformação, mas não foi bem compreendido na época. Só em 1944 Avery, MacLeod e McCarty (17) desvendaram o mecanismo. Eles, por meio de exaustivos testes, conseguiram demonstrar que era um componente químico das células virulentas, o ácido desoxirribonucléico ou DNA, o responsável pela transformação das células avirulentas em virulentas. Foi demonstrado dessa maneira não só um sistema de recombinação em bactérias, mas também que o DNA era o material genético das mesmas, o que depois foi generalizado para praticamente todos os seres vivos. O processo de transformação, ao contrário do que ocorre na conjugação bacteriana,

não requer um contato entre duas células, nem tipos de reação sexual distintos. É assim um mecanismo alternativo do sexo, mas que, da mesma forma que a conjugação, produz recombinantes. Tendo sido descrito em *S. pneumoniae*, verificou-se logo em seguida que outras bactérias também eram capazes de serem transformadas para as mais diversas características e não apenas para virulência. Atualmente pode-se dizer que qualquer gênero ou espécie bacteriana, dependendo das condições de cultivo e certos componentes químicos adicionados ao meio, podem sofrer transformação. Também pode ser transformada qualquer característica genética bacteriana, seja auxotrofia, morfologia de colônia, resistência a agentes inibidores, etc.

AS FASES DA TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA – Assim como ocorre na conjugação, a transformação pode ser dividida em etapas ou fases. Na natureza, antecedendo ao processo propriamente dito, deve ocorrer lise de células de tal modo que seu DNA fica livre no meio. Em laboratório existem diferentes métodos para extração do DNA das células que vão doar esse ácido nucléico, que são chamadas de doadoras, para as células que vão receber o DNA, ditas receptoras. O material genético assim extraído é chamado de DNA exógeno. Esse DNA deve ter tamanho relativamente grande para que a transformação seja eficiente e deve estar em seu estado de fita dupla. Também é necessário que as células receptoras estejam em um estado de aptidão para receber o DNA. Esse estado, chamado de “competência”, depende de diferentes fatores: existência de receptores específicos para o DNA, fase de crescimento bacteriano, que por sua vez produz modificações na membrana e modificações no meio de cultura, que podem propiciar aumento ou diminuição da competência. Atualmente, determinadas técnicas como a eletroporação (abertura de poros da membrana por forças elétricas), ou a utilização de protoplastos (células sem parede) podem aumentar a frequência de transformação. Fatores genéticos também estão envolvidos, tendo sido inclusive isoladas linhagens *com-*, isto é, constituídas por células não competentes e portanto incapazes de sofrer transformação. Uma vez existindo DNA nativo, ou de fita dupla disponível, e existindo células competentes, o contacto célula competente-DNA pode ocorrer. As fases que se desenrolam durante a transformação são as seguintes: a) Entrada do DNA exógeno na célula receptora – embora ele precise estar em seu estado nativo de dupla hélice, com algumas exceções apenas uma fita do DNA penetra na célula receptora. O processo de entrada é bastante complexo e seus detalhes não são bem conhecidos. b) Incorporação do DNA exógeno no cromossomo da célula receptora: o DNA que penetrou na célula receptora vai se parear com a região homóloga do cromossomo da mesma. O mecanismo de permutação ou “crossing-over” ocorre como na conjugação. c) Formação de recombinantes: nas próximas duplicações do DNA o segmento que foi incorporado ao cromossomo vai também sofrer duplicação. Carregando um ou mais genes distintos em relação aos da célula receptora, pode haver modificação em uma ou mais características genéticas de células descendentes (Fig. 3.8).

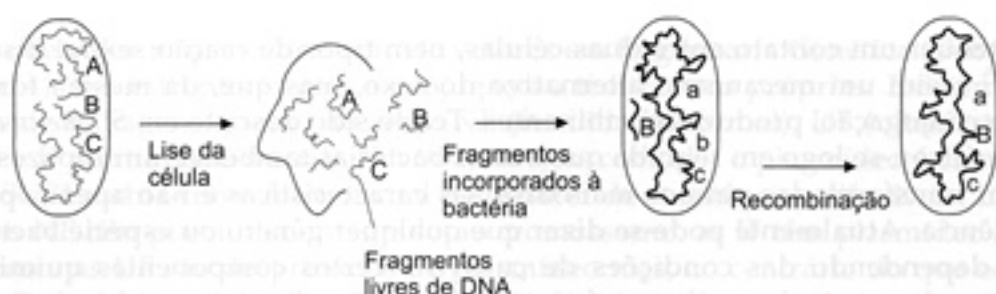


Figura 3.8 – Transformação bacteriana. A, B e C são genes da célula doadora, sendo que a, b e c são genes homólogos na célula receptora. O gene B substituiu o gene b na célula receptora.

A UTILIZAÇÃO DO MECANISMO DE TRANSFORMAÇÃO - Além da entrada de DNA cromossômico nas células receptoras por transformação, pode-se também introduzir elementos extracromossômicos como plasmídeos. Tendo duplicação independente da do cromossomo bacteriano, esses plasmídeos podem permanecer nas células receptoras e em seus descendentes, introduzindo novas características genéticas nas mesmas. Se esses plasmídeos possuírem genes provenientes de outras espécies bacterianas ou mesmo de outros organismos, como plantas, animais ou da própria espécie humana, uma bactéria assim transformada poderá produzir novas substâncias. É dessa maneira que certos hormônios, como insulina, somatostatina e o de crescimento humano são hoje produzidos por bactérias como a *E. coli*. Nesse caso os plasmídeos funcionam como vetores de genes exógenos. Essa tecnologia de Engenharia Genética propiciou grandes avanços biotecnológicos, permitindo a construção de linhagens bacterianas e de outros microrganismos transformados, constituindo-se em verdadeiras fábricas de fármacos e outros produtos.

A transformação é também um ótimo sistema genético para o estudo da genética bacteriana. Por meio de transformação pode-se combinar genes de diferentes linhagens em uma mesma, fazer mapeamento genético e construir mapas genéticos bastante detalhados de regiões do genoma das espécies estudadas. Por exemplo, sendo os segmentos de DNA que entram dentro das células da ordem de 200 a 500 vezes menores que o cromossomo, dificilmente dois genes distintos dos existentes nas células receptoras vão ser incorporados em conjunto. Quando isso ocorre (co-transformação) está demonstrada a grande proximidade desses genes no cromossomo bacteriano.

A descoberta de transformação em outros microrganismos, como fungos filamentosos e leveduras e a utilização em larga escala do mecanismo na Tecnologia do DNA recombinante, fazem com que esse sistema de recombinação seja de grande importância para estudos genéticos e para a manipulação de bactérias e outros microrganismos.

3.3.1.3 – Transdução

Além da transformação, um outro mecanismo de alternativa do sexo designado de transdução foi descrito em 1952 na bactéria *Salmonella typhimurium*.

Ele pode ser considerado um refinamento do processo de transformação. Na transdução, bactérias são também modificadas em suas características genéticas por um DNA vindo de outras bactérias. Entretanto, nesse caso o DNA é carregado por vírus que atacam bactérias, os chamados bacteriófagos ou abreviadamente, fagos. Esses fagos infectam uma determinada bactéria, lisam a mesma e podem ter um segmento do DNA bacteriano substituindo seu próprio DNA, ou mesmo ter alguns genes da bactéria incorporados ao seu genoma. Assim, quando infectar uma nova bactéria, ele vai carregar esse material para a célula hospedeira, desencadeando a transdução.

OS TIPOS DE TRANSDUÇÃO – Existem basicamente três tipos distintos de transdução: generalizada, específica ou restrita e transdução abortiva. Cada um deles vai ser visto em seguida.

TRANSDUÇÃO GENERALIZADA – Se um fago lisa uma célula selvagem e depois vai infectar células mutantes, dentre elas aparecem algumas contendo genes das células lisadas. Em geral, cada célula é modificada apenas para uma característica genética. Isso ocorre porque, como já mencionado, quando um fago ataca uma bactéria e mata a mesma, algumas partículas virais das centenas ou milhares que são liberadas, por um erro de incorporação, possuem um pedaço do DNA do cromossomo bacteriano em lugar do DNA do próprio fago (Fig. 3.9).

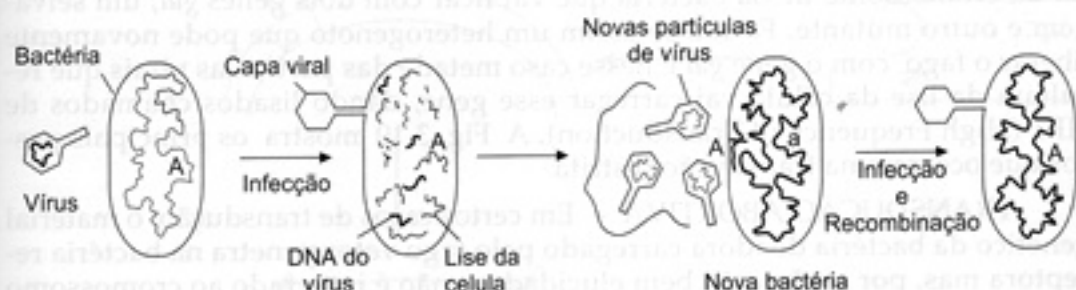


Figura 3.9 – A transdução generalizada em bactérias. O gene A da célula doadora substituiu o gene a na célula receptora.

Resultam assim de uma célula lisada um ou poucos fagos que contêm no interior de sua capa protéica DNA de bactéria. Isso não impede que esse fago alterado infecte um nova célula e injete o DNA dentro da mesma. Aí, evidentemente não vai haver lise, mesmo que a célula receptora seja sensível ao fago. O DNA no interior da bactéria vai se comportar como na transformação, isto é, vai haver um pareamento entre esse segmento adicionado à célula, com o correspondente homólogo do cromossomo bacteriano, "crossing-over" e aparecimento de recombinantes. Nesse tipo de transdução, qualquer gene bacteriano pode ser carregado da célula doadora para a receptora e por isso ela é chamada de transdução generalizada. Como são muitos os fagos que infectam diferentes espécies de bactérias, o processo é de ocorrência ampla, tendo sido detectado em diferentes gêneros de bactérias, tanto gram-positivas como gram-negativas.

TRANSDUÇÃO ESPECÍFICA OU RESTRITA – Morse, Lederberg e Lederberg (24), procurando novos vírus que poderiam servir de vetores para efetuar a transdução, verificaram que um determinado fago chamado de lambda (λ) era capaz disso, mas que a grande maioria das bactérias que sofriam transdução só o faziam para um gene, o que condicionava ou não a utilização de galactose como única fonte de carbono (*gal*). Esse fago é do tipo lisogênico, isto é, pode ser incorporado ao cromossomo bacteriano. Nesse caso ele não lisa a célula mas se multiplica juntamente com o cromossomo da mesma, protegendo-a do ataque por fagos relacionados. Um fago incorporado ao cromossomo está em um estado designado de profago. Entretanto, espontaneamente ou induzido por luz ultravioleta, ele pode sair desse estado, liberando-se do cromossomo bacteriano. O DNA do fago agora livre se multiplica e centenas de partículas virais com capa protéica são formadas e liberadas lisando a célula. Uma pequena fração dos fagos liberados, quando saem do cromossomo, carregam consigo parte do cromossomo, à semelhança do que ocorre com o plasmídeo F quando se modifica em F' (ver conjugação). Como o local de ligação do fago no cromossomo bacteriano é sempre próximo ao gene *gal*, é ele que vai ser incorporado ao fago. Raramente outro gene, o da deficiência nutricional para biotina (*bio*), que está um pouco mais distante do que *gal* no local de incorporação do fago, é também transferido. Quando esse fago, carregando o gene *gal*+, por exemplo, vai infectar uma bactéria *gal*-, ele pode se incorporar ao cromossomo dessa bactéria que vai ficar com dois genes *gal*, um selvagem e outro mutante. Forma-se assim um heterogenoto que pode novamente liberar o fago com o gene *gal* e nesse caso metade das partículas virais que resultam da lise da célula vai carregar esse gene, dando lisados chamados de HFT (High Frequency of Transduction). A Fig. 3.10 mostra os principais passos que ocorrem na transdução restrita.

TRANSDUÇÃO ABORTIVA – Em certos casos de transdução, o material genético da bactéria doadora carregado pelo fago vetor penetra na bactéria receptora mas, por razões não bem elucidadas, não é integrado ao cromossomo bacteriano e, não tendo duplicação autônoma, também não se duplica dentro dela. Exemplificando para o caso de um gene selvagem para uma auxotrofia, transduzido para uma célula receptora que possui essa auxotrofia, o que vai ocorrer é que o gene introduzido propicia a síntese da substância em falta. Entretanto, quando a bactéria se divide em um meio mínimo, apenas uma das células filhas irá ter o segmento e só ela poderá dividir-se novamente. Assim, em lugar de um crescimento em escala geométrica, vai ocorrer um crescimento em escala aritmética. Formam-se então em um meio sólido colônias minúsculas, características da transdução abortiva. A transferência das células de uma dessas colônias para um novo meio mínimo dá como resultado apenas uma colônia minúscula, que é resultante da célula que tem o segmento transduzido (Fig. 3.11). Em geral o número de transduções abortivas, comparado com o de transduções generalizadas, é 20 a 30 vezes maior. Isso indica que a probabilidade de um segmento transduzido ser incorporado ao cromossomo da célula receptora é pequena, em comparação com a probabilidade de sua não incorporação.

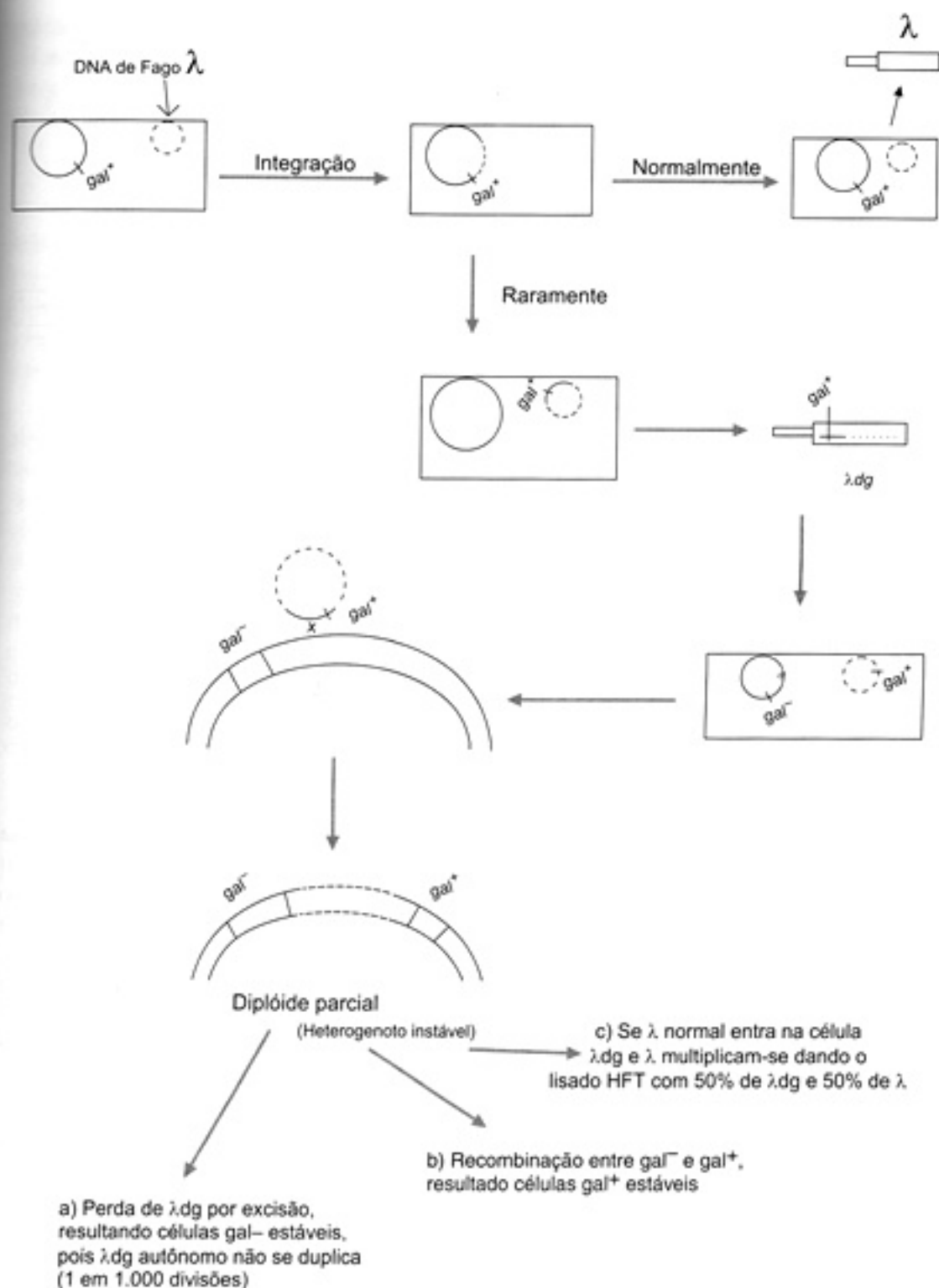
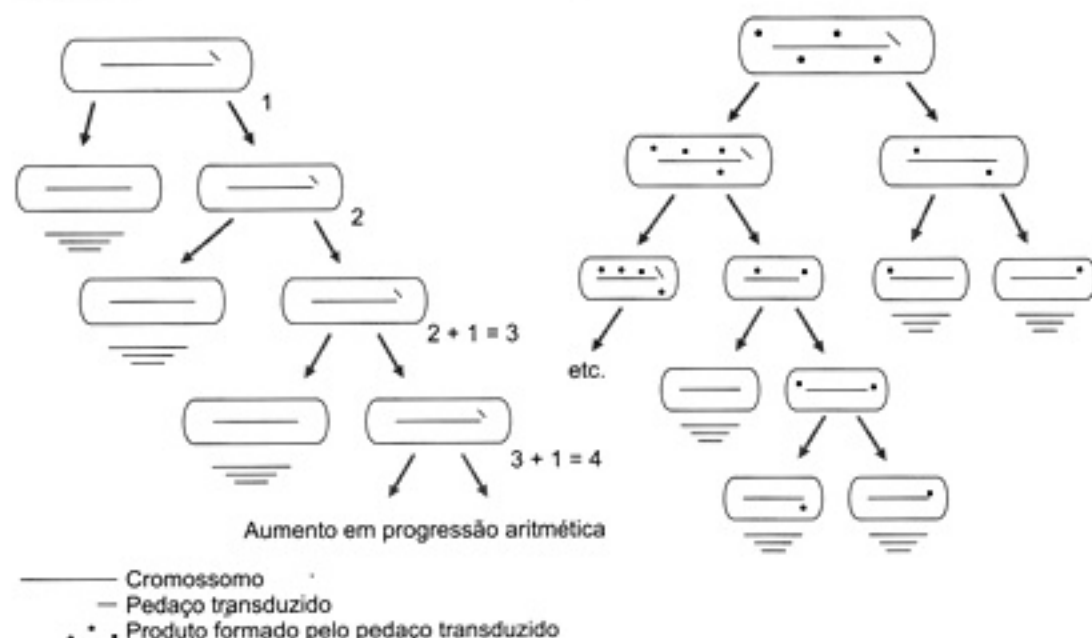


Figura 3.10 – A transdução restrita em bactéria com a passagem do gene da utilização da galactose como fonte de carbono (*gal*).

a) Só células com segmento transduzido são capazes de se dividir.

b) Células sem fragmento podem sofrer algumas divisões antes de o produto diluir-se.



gênica também são realizados via transdução. Bacteriófagos e outros vírus podem também ser usados, à semelhança dos plasmídeos, como vetores em Engenharia Genética. Aliás, plasmídeos e fagos têm muito em comum, supondo-se que a origem dos plasmídeos seja viral.

3.3.1.4 – Transposição do material genético e tecnologia do DNA recombinante

Os três sistemas de recombinação descritos acima não são artefatos de laboratório e devem ocorrer na natureza, permitindo troca de material genético em bactérias. A eles podem ser adicionados mais dois sistemas, o primeiro também natural e o segundo constituindo-se muito mais em uma manipulação genética em laboratório do que um sistema natural de troca de DNA entre células.

TRANSPOSONS – O genoma dos seres vivos sempre foi considerado como formado por seqüências bastante estáveis, somente modificadas por mutação. Embora existissem exemplos de que o material genético poderia sofrer transposições de um local para outro do genoma, como em milho (25) e mesmo em fungos (26), esses casos eram considerados como exceções. Foi preciso que o processo de transposição fosse elucidado do ponto de vista molecular em bactérias, para que ele pudesse ser aceito definitivamente pelos geneticistas. Hoje sabe-se que o mecanismo de transposição é geral e se constitui em um processo que aumenta a variabilidade nos seres vivos, sendo de grande importância para a evolução, regulação gênica e diferenciação. Transposons foram pela primeira vez descritos do ponto de vista molecular, quando se verificou que mutações chamadas polares em sistemas de regulação gênica bacteriana eram causadas por segmentos de DNA inseridos em genes. Esses segmentos ou IS (*Insertion Segments*) têm em média 700 a 1.500 pares de nucleotídeos que codificam proteínas envolvidas no próprio mecanismo de transposição. A Tab. 3.1 apresenta algumas propriedades de diferentes transposons.

Tabela 3.1 – Algumas características de determinados segmentos de inserção (IS) em bactérias.

Tipos de IS	Tamanhos (pares de bases)	Número de pares de bases dos terminais invertidos repetidos	Número de proteínas codificadas
IS-1	768	23	2
IS-4	1428	18	2
IS-5	1195	16	4
IS-10R	1329	22	3

Logo a seguir foram descritos outros elementos transponíveis em bactérias, bem maiores que os IS carregando genes, como os de resistência a antibióticos entre outros. Esses genes eram flanqueados por ISs e o conjunto foi chamado de transposon (Tn). Atualmente tanto IS como Tn tomam a designação geral de transposons. A Fig. 3.12 mostra um desses transposons. Normal-

mente uma bactéria carrega vários transposons. A linhagem de *E. coli* K12 possui pelo menos 14 transposons em seu cromossomo e três em seu plasmídeo F.

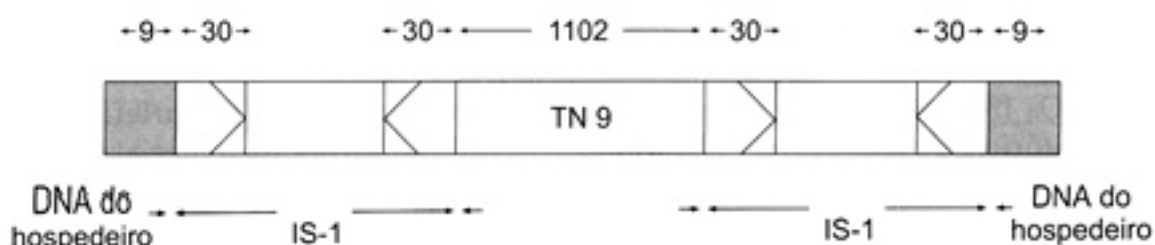


Figura 3.12 – O transposon Tn9 encontrado em bactérias, carregando um gene que confere resistência ao antibiótico cloranfenicol. Os números indicam as quantidades de pares de bases. IS1 é um segmento de inserção.

O MECANISMO DE TRANSPOSIÇÃO – O processo se inicia pela duplicação do elemento transponível e termina com sua inserção em outro local do genoma. A duplicação não acarreta a locomoção do transposon original, mas sim de sua cópia. Essa cópia vai ligar-se ao DNA alvo em outro local do cromossomo ou elemento extracromossômico. Mais detalhes sobre esse mecanismo e sobre as enzimas envolvidas, podem ser encontradas em revisões sobre o assunto (1, 27, 28). Esse sistema, logo após sua descoberta, foi chamado de “recombinação ilegítima”, pois independe das enzimas normalmente usadas para efetuar recombinação clássica através de permuta ou “crossing-over”. No entanto, logo foi visto que esse é um sistema tão natural quando o anteriormente conhecido. A transposição permite que os transposons funcionem como interruptores em sistemas de regulação, permite que novas informações genéticas sejam introduzidas em uma célula e apresenta assim um potencial muito grande para aumentar a variabilidade e sobrevivência de células. Possivelmente plasmídeos designados de R, semelhantes ao F, mas que carregam genes de resistência a um ou vários agentes inibidores de bactérias como antibióticos, quimioterápicos e metais pesados, foram formados por transposições de diferentes origens, selecionados em um plasmídeo único. Tal plasmídeo confere às bactérias uma vantagem seletiva na presença desses inibidores.

OUTROS EXEMPLOS DE TRANSPOSONS – Certos bacteriófagos como o Mu (Mutador), também funcionam como transposons, inserindo-se em várias regiões do cromossomo bacteriano e causando mutações. Em fungos filamentosos e leveduras, também são relativamente bem descritos casos de transposons. Em leveduras, variações no tipo de reação sexual ou “mating-types” são ocasionadas por transposições de material genético. Em plantas e animais superiores também transposições foram detectadas em grande número. A descoberta desse sistema de recombinação lançou novas luzes aos fenômenos ligados à alta instabilidade genética apresentada por alguns microrganismos e dificilmente explicada pela genética até então. É o caso de variação de fase em *Salmonella*, tipos de reação sexual em leveduras, instabilidade mitótica em fun-

gos filamentosos, alguns de importância industrial, capacidade de alta resistência a vários inibidores em células bacterianas e muitos outros. Os transposons são responsáveis por uma verdadeira Engenharia Genética *in vivo* nas células. Em alguns microrganismos que vivem dentro de plantas, os endófitos, parece existir uma certa coincidência de genes iguais ou semelhantes em ambos. Se confirmados esses achados, estaria demonstrada a possibilidade de transferência por transposição, ou mecanismo similar, entre genes de células de reinos diferentes. Esse processo já foi demonstrado em bactérias que causam tumores em plantas, como as do gênero *Agrobacterium*, que podem ter um seu plasmídeo designado de Ti incorporado ao genoma da planta. Entretanto, a existência de um fluxo gênico entre gêneros, famílias ou mesmo reinos distintos, pode demonstrar que a Engenharia Genética é um sistema também natural de recombinação usado pelos seres vivos, embora ocorra com frequência reduzida.

A TECNOLOGIA DO DNA RECOMBINANTE – Descrita pela primeira vez em bactérias no início dos anos 70, a tecnologia do DNA recombinante foi ampliada rapidamente para outros microrganismos e, depois, para todos os seres vivos. Ela é considerada um sistema de recombinação artificial, por manipulação do material genético de células e introdução de novas características nas mesmas. Do ponto de vista genético é um sistema de recombinação que aumenta a possibilidade de obter variabilidade. Do ponto de vista biotecnológico, ela pode produzir linhagens de importância econômica. Essa tecnologia vai ser vista em detalhes em outro capítulo desta mesma publicação.

3.3.2 – Recombinação em fungos

Como acontece em bactérias, a recombinação em muitas espécies de fungos pode ocorrer por mais de um mecanismo. Sendo microrganismos eucarióticos, os fungos possuem núcleo típico e muitas espécies apresentam um ciclo sexual similar ao dos animais e plantas superiores. Entretanto, grande parte do ciclo vital da maioria dos fungos é haplóide. A fase diplóide é bastante rápida, pois assim que dois núcleos se fundem e dão um núcleo diplóide, ocorre meiose com volta ao estado haplóide. Além do mais, os chamados Fungos Imperfeitos ou Deuteromicetos não possuem ou ainda não tem descrito seu ciclo sexual. Nesses fungos e mesmo em outros que possuem ciclo sexual existe um sistema alternativo de sexo, denominado de ciclo parassexual, descrito pela primeira vez por Pontecorvo e Roper em 1952 (29). Também em fungos, à semelhança das bactérias, transformação por DNA pode ser usado como um sistema de recombinação. Para forçar a parassexualidade são usadas técnicas eficientes como fusão de protoplastos. Finalmente, também da mesma maneira que em bactérias, a tecnologia do DNA recombinante pode ser usada para produzir novos genótipos. Esses sistemas de recombinação em fungos serão apresentados a seguir.

Todas as três espécies têm sido amplamente usadas em Genética. Nesses fungos e em outros que possuem ciclo sexual fica fácil estabelecer cruzamentos para estudos genéticos e para programas de melhoramento genético. Existindo mutantes, a análise genética pode ser realizada com facilidade e, dependendo do fungo, as análises podem ser feitas a partir de esporos sexuais ordenados em compartimento do corpo de frutificação, como ocorre em *Neurospora crassa*. Pode ser feita também por análise de esporos sexuais não ordenados como em *Saccharomyces cerevisiae* ou, ainda, por esporos sexuais coletados ao acaso como em *Aspergillus nidulans*. A Fig. 3.16 mostra alguns exemplos dessas análises genéticas.

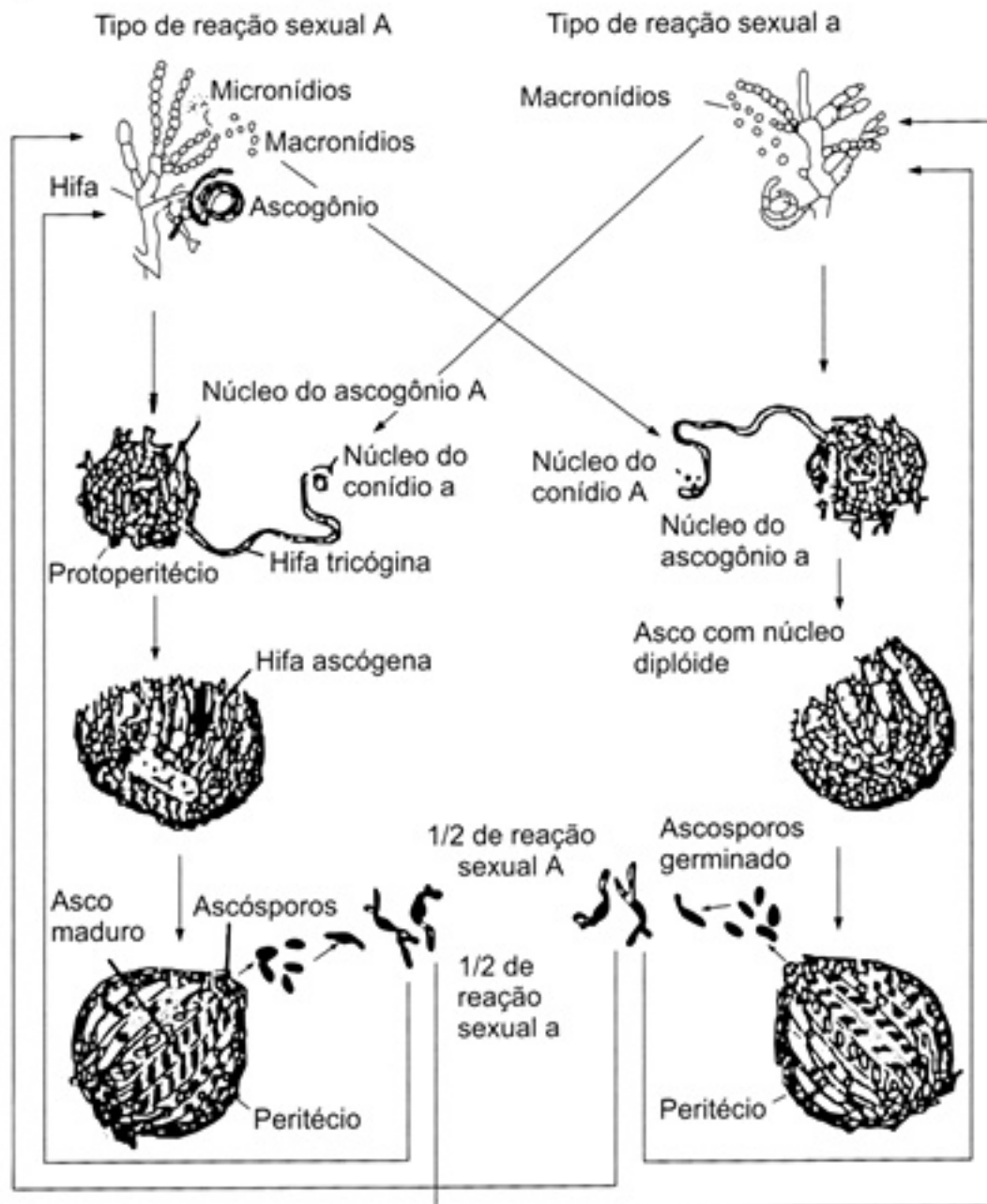


Figura 3.14 – O ciclo sexual no fungo *Neurospora crassa* (Strickberger, 13)

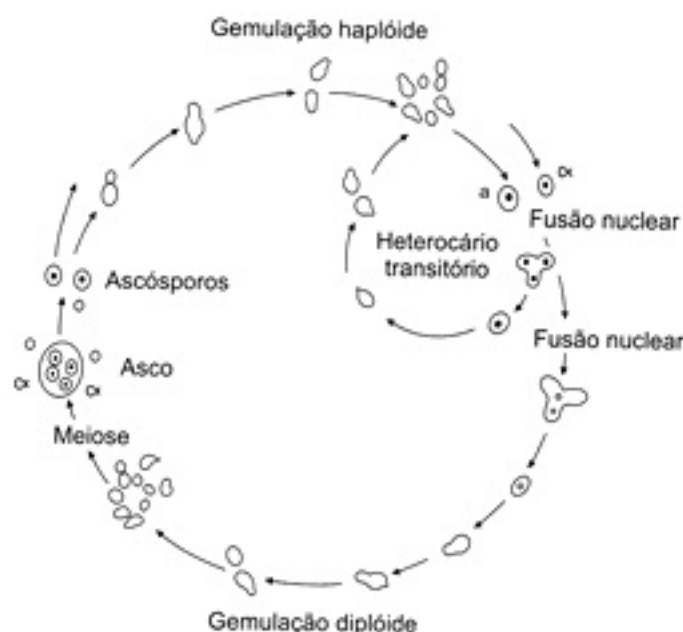


Figura 3.15 – O ciclo sexual na levedura *Saccharomyces cerevisiae* com 2 tipos de reação sexual (α e a) (Fincham et al., 12)

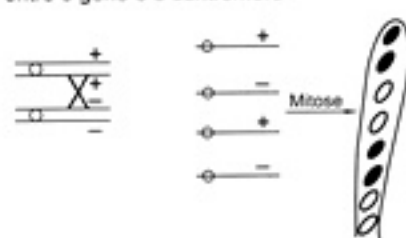
3.3.2.2 – O ciclo parassexual em fungos

O ciclo parassexual foi descrito pela primeira vez no fungo *A. nidulans*. Graças à existência de mutantes para coloração de conídeos e mutantes auxotróficos, foi possível colocar duas linhagens de cores de conídeos distintas e auxotrófias também distintas em um meio líquido mínimo, com uma pequena quantidade de meio completo para permitir apenas o início da germinação dos conídeos. Nesse caso, ocorreram anastomoses de hifas com a formação de heterocários (dois núcleos geneticamente distintos em um citoplasma comum). Esses heterocários podiam crescer em meio mínimo, pois um núcleo fornecia o que faltava para o outro. Entretanto, como o fungo tem conídios uninucleados, os conídeos dos heterocários eram iguais aos das linhagens que o formaram e não podiam crescer no meio mínimo. A semeadura de milhões de conídeos provenientes de um heterocário em meio mínimo produziu, entretanto, algumas colônias prototróficas. Essas, com surpresa, eram diplóides, o que foi constatado pelo volume de seus conídeos, que era o dobro do das linhagens originais que formaram o heterocário, pela quantidade de DNA em seus núcleos que era também o dobro da encontrada em conídeos haplóides e pela possibilidade que essas colônias tinham de formar setores, principalmente se transferidos para meio completo. A análise genética desses setores revelou serem alguns recombinantes haplóides, originando-se por um processo de não disjunção com perda de cromossomos até o estado original haplóide ser atingido. Outros eram diplóides, originando-se por permutação ou "crossing-over" mitótico (Fig. 3.17).

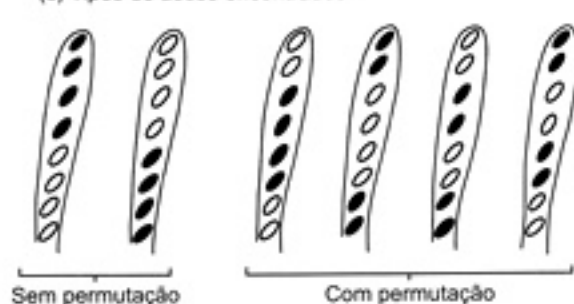
(a) Sem permutação



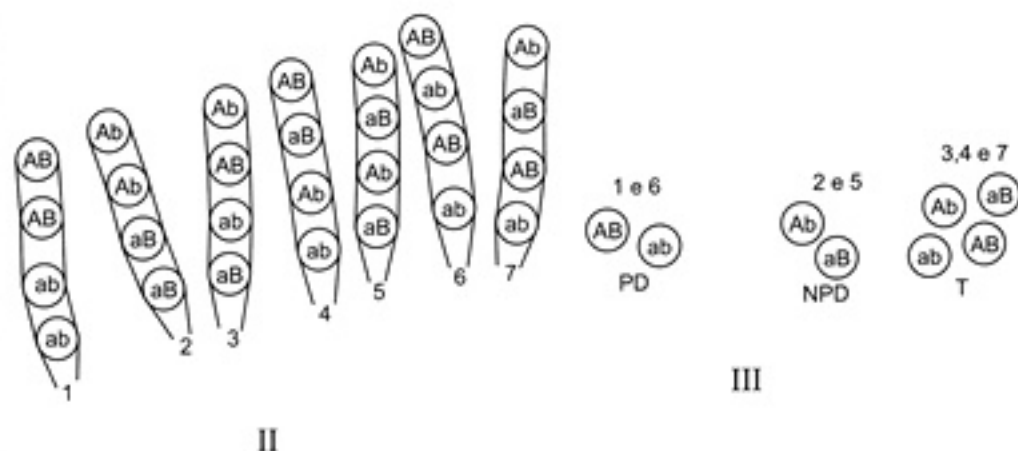
(b) Permutação entre o gene e o centrômero



(c) Tipos de ascas encontrados



I



II

III

Figura 3.16 – Exemplos de análise genética em fungos. I - Análise genética em fungos contendo ascas com oito ascósporos ordenados em seu interior ($+$ = esporos pretos e $-$ = esporos branco). Nesses fungos é possível construir mapas genéticos para determinação da distância entre um gene e o centrômero. II - Tipos de ascas com ascósporos ordenados quando dois genes são analisados conjuntamente (genes A e B). III - Se esses mesmos ascas são analisados de forma não ordenada dos 7 tipos encontrados em II, resultam tetradas parentais ditípicas (PD), não parentais ditípicas (NPD) e tetratípicas (T), o que ainda permite que várias relações entre os genes analisados possam ser obtidas.



Figura 3.17 – O ciclo parassexual em fungos.

Em ambos os casos apareceram recombinantes, o que permitiu um novo processo de análise genética, propiciando um rápido mapeamento de genes em seus respectivos cromossomos. Após ser descrito em *A. nidulans*, ele foi constatado em *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum* e muitos outros fungos imperfeitos que não possuíam ciclo sexual e que, portanto, não eram facilmente estudados do ponto de vista genético. Dentre os deuteromicetos estão importantes fungos de interesse biotecnológico utilizados na produção de antibióticos, ácidos orgânicos, enzimas, no controle biológico de insetos, etc. O ciclo parassexual como alternativa do sexo, permitiu que a genética e o melhoramento genético fosse feito com grande sucesso como em *A. niger*, *Trichoderma* e *Penicillium*. Em *A. nidulans* que possui ambos os ciclos sexual e parassexual, uma comparação entre os mesmos pode ser feita (Tab. 3.2).

Hoje o ciclo já é conhecido em dezenas de fungos (Tab. 3.3). Variações nesse ciclo podem ocorrer. Uma delas, descoberta em *A. niger* é a paramiose (30) onde recombinantes podem ser obtidos sem isolamento de um diplóide estável (Fig. 3.18). A paramiose já foi descrita em *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*, ambos de valor no controle biológico de insetos (31, 32) e pode ser explicada como sendo causada por diplóides transitórios, transposons ou mesmo por transformação dentro das hifas.

Tabela 3.2 – Comparação entre os principais eventos que ocorrem nos ciclos sexual e parassexual.

<i>Ciclo sexual</i>	<i>Ciclo parassexual</i>
1. Fusão nuclear em estruturas especializadas nas hifas, resultando zigotos diplóides.	1. Fusão nuclear rara em qualquer ponto da hifa, dando diplóides.
2. O zigoto formado é efêmero, persistindo por apenas uma geração nuclear.	2. O diplóide não é efêmero e sofre mitoses, dando mais núcleos diplóides.
3. Meiose com recombinação meiótica no estágio de quatro fios e volta ao estágio haplóide.	3. Recombinação rara por permutação mitótica. Ocorre haploidização rara por não disjunção.
4. Os produtos meióticos (ascósporos) são facilmente reconhecidos e isolados.	4. Os recombinantes mitóticos, se utilizados marcadores apropriados, emergem como setores oriundos de colônias diplóides.

3.3.2.3 – Fusão de protoplastos em fungos

Embora seja um mecanismo parassexual de obtenção de recombinantes facilitando heterocariose, que é o primeiro passo da parassexualidade, a fusão de protoplastos, pela sua importância, vai ser descrita separadamente do ciclo parassexual. Mesmo em fungos que possuem ciclo sexual ou parassexual a heterocariose nem sempre é possível, devido à incompatibilidade de anastomoses ocasionada pela parede celular. A possibilidade de se produzir células inteiramente desprovidas ou apenas com resquícios de parede celular, os protoplastos (com total ausência de parede) ou esferoplastos (devido ao seu formato esférico em meio rico em estabilizadores osmóticos, podendo conter ou não restos de parede) abriu a possibilidade de se fundir células as mais diversas, não só de fungos mas de praticamente quaisquer células vivas. Evidentemente quanto mais distantes são as células de espécies fusionadas, mais difícil fica sua viabilidade e multiplicação. Protoplastos podem ser obtidos de diferentes maneiras, mas, de modo geral, o tratamento de um fungo com enzimas que destroem a parede celular é o preferido. Isso é feito em meio com alta concentração de sais ou açúcares (estabilizadores osmóticos), para evitar o rompimento das células. Os detalhes de obtenção de protoplastos podem ser encontrados em várias publicações (1, 2, 27, 33, 34, 35, 36). Obtidos os protoplastos, a fusão pode ser feita por adição de agentes fusogênicos ao meio, como o polietileno glicol ou abreviadamente PEG, ou por correntes elétricas, por um processo conhecido como eletrofusão (Fig. 3.19).

Tabela 3.3 – Exemplos de espécies de fungos onde ocorre o ciclo parassexual.

<i>Ascochyta imperfecta</i>
<i>Aspergillus amstelodami</i>
<i>Aspergillus flavus</i>
<i>Aspergillus fumigatus</i>
<i>Aspergillus nidulans</i>
<i>Aspergillus niger</i>
<i>Aspergillus oryzae</i>
<i>Aspergillus rugulosus</i>
<i>Aspergillus sojae</i>
<i>Beauveria bassiana</i>
<i>Cephalosporium acremonium</i>
<i>Cephalosporium mycophyium</i>
<i>Cochliobolus sativus</i>
<i>Coprinus fimetarius</i>
<i>Coprinus lagopus</i>
<i>Dictyostelium discoideum</i> (mixomiceto)
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>callistephi</i>
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>pisi</i>
<i>Fusarium redolens</i>
<i>Metarhizium anisopliae</i>
<i>Microsporum gypsum</i>
<i>Penicillium chrysogenum</i>
<i>Penicillium digitatum</i>
<i>Penicillium expansum</i>
<i>Penicillium italicum</i>
<i>Phycomyces blakesleanus</i>
<i>Phymatotrichum omnivorum</i>
<i>Phytophthora infestans</i>
<i>Piricularia oryzae</i>
<i>Puccinia graminis tritici</i>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Schizophyllum commune</i>
<i>Ustilago hordei</i>
<i>Ustilago maydis</i>
<i>Ustilago violacea</i>
<i>Verticillium albo-atrum</i>
<i>Verticillium dahliae</i> var. <i>longisporum</i>

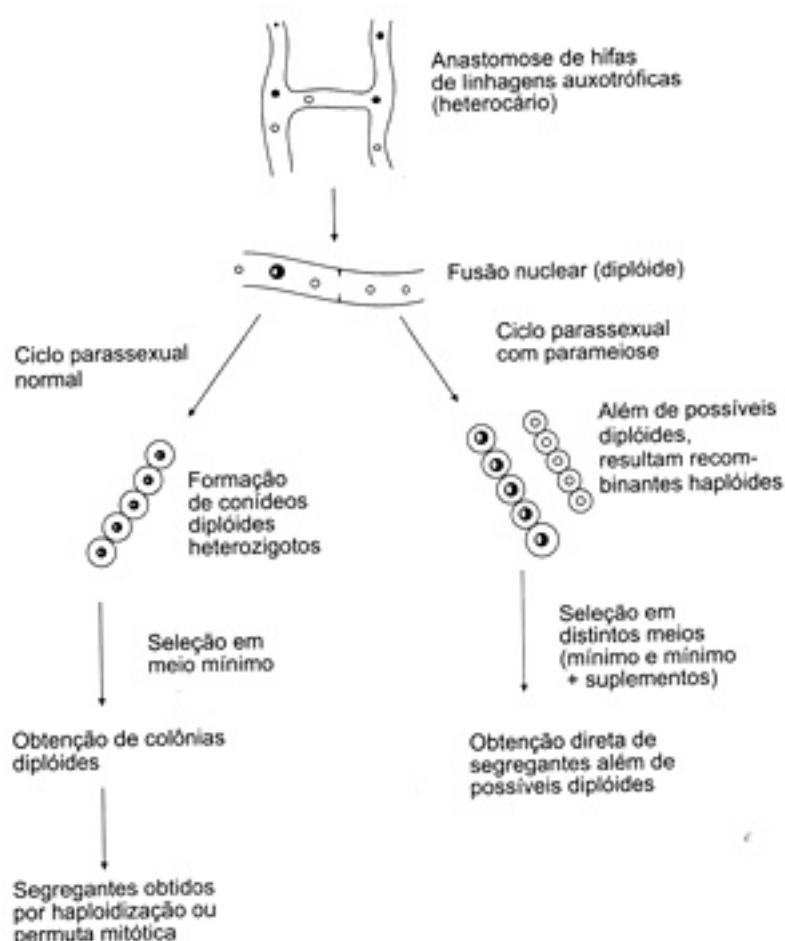


Figura 3.18 – Comparação entre o ciclo parassexual típico e a paramiose em fungos.

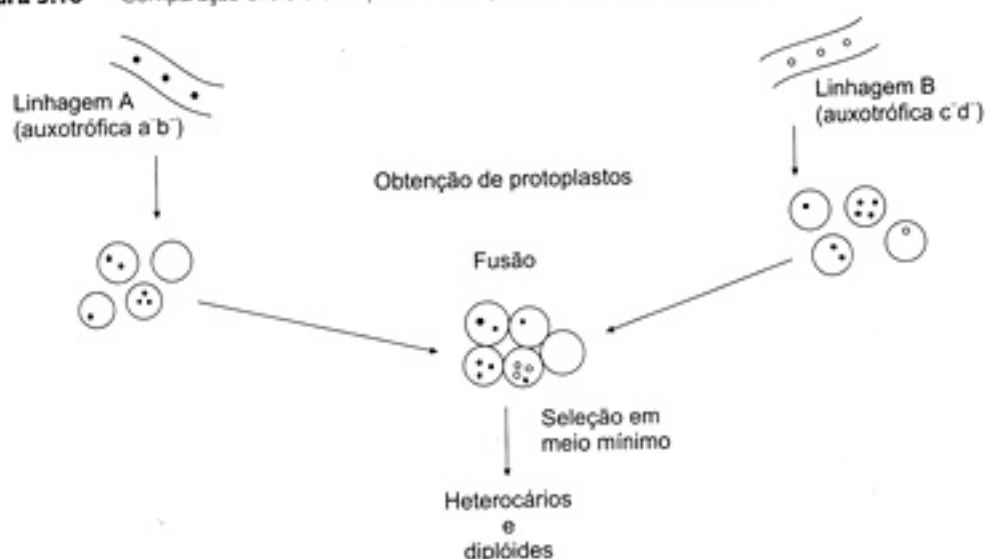


Figura 3.19 – Fusão de protoplastos em fungos (a⁻, b⁻, c⁻ e d⁻ representam mutantes auxotróficos).

De muitos protoplastos usados, apenas alguns sofrem fusão. É necessário então uma seleção dos produtos de fusão, que é facilitada se forem usadas linhagens com mutantes apropriados, como auxotróficos, resistentes a drogas etc. Em geral, heterocários são recuperados em meio mínimo, utilizando-se linhagens mutantes com deficiências complementares. Desses produtos de fusão, diplóide e recombinantes podem ser obtidos. As barreiras de incompatibilidade, rompidas pelo uso de protoplastos, permitiram que fusões pudessem ser realizadas entre espécies e mesmo gêneros distintos de fungos. O primeiro exemplo bem documentado foi a fusão de duas espécies relacionadas, o *A. nidulans* e o *A. rugulosus*. Os produtos de fusão permitiram uma comparação entre mapas genéticos das duas espécies, abrindo possibilidades de se estudar similaridades entre fungos, inclusive aspectos taxonômicos dos mesmos via fusão de protoplastos. Atualmente, são conhecidos muitos casos de fusões de protoplastos em leveduras e fungos filamentosos. Algumas dessas fusões produziram recombinantes de grande valor industrial como em *Cephalosporium acremonium*, produtor do antibiótico cefalosporina (35) e em leveduras para fins enológicos (37). Os protoplastos são também fundamentais para que outros processos de recombinação possam ser usados em fungos, como a transformação e, conseqüentemente, a Engenharia Genética. Protoplastos de fungos são empregados também para separação eletroforética de cromossomos em géis de campo pulsado (38, 39).

3.3.2.4 – Transformação em fungos

Uma das grandes dificuldades do uso de fungos em Biologia Molecular foi a inexistência de um sistema de entrada de DNA nos mesmos via transformação, como ocorre em bactérias. A situação começou a ser modificada, quando células incapazes de utilizar inositol em *N. crassa* foram capazes de fazê-lo ao receber DNA de linhagem selvagem. Essa transformação ocorria em frequências muito baixas e os transformantes eram instáveis. Foi só em 1978 que a transformação genética foi obtida com frequências maiores em *S. cerevisiae*. Um ano mais tarde o mesmo foi conseguido em *N. crassa*. Hoje o processo está bem estabelecido, não mais utilizando-se um DNA isolado, mas sim plasmídeos carregando genes de fungos. A extração de DNA de células doadoras é o primeiro passo na transformação. Esse DNA é colocado em vetores, em geral plasmídeos, e clonado em células bacterianas, por exemplo. O segundo passo é a preparação das células receptoras. Elas têm que estar em um estado de competência e isso pode ser conseguido com certas substâncias químicas, como acetato de lítio em leveduras ou então protoplastizando as células, em fungos filamentosos. Protoplastos em presença de PEG ou por eletroporação são muito receptivos ao DNA exógeno. Finalmente a introdução do DNA exógeno, em geral plasmídeos com genes de fungos em células hospedeiras, produz transformação.

Há três destinos desse DNA que penetra nas células. Ele pode ser integrado ao cromossomo do fungo em local de homologia com o genoma carregado, ele pode substituir o gene homólogo no fungo por permuta ou ele pode ser inserido em outro local do genoma do fungo que não a região homóloga a ele. Em qualquer dos casos está ocorrendo recombinação. Dessa maneira o processo de transformação em fungos é de grande importância para a realização de pesquisas básicas e aplicadas nesse Reino.

3.3.2.5 – A tecnologia de DNA recombinante em fungos

A transformação genética elucidada e tornada rotina em fungos, aliada à facilidade de produção de protoplastos, tornou possível a aplicação da tecnologia do DNA recombinante nos mesmos. Atualmente a clonagem de genes em fungos e sua expressão é comumente realizada, ampliando sobremaneira as possibilidades de obtenção de novos produtos importantes do ponto de vista biotecnológico, tendo esses microrganismos como hospedeiros. Fungos como *S. cerevisiae* e *A. niger*, além do *Penicillium*, são usados há muito tempo na produção de bebidas, alimentos e fármacos. Isso faz com que seu uso como vetores não cause tantos problemas de ordem ética, ambiental e de rejeição como bactérias, principalmente a *E. coli*. Detalhes do uso dessa tecnologia podem ser encontrados em Azevedo (1, 2, 27), Costa (3), Lewin (40) e no capítulo sobre Engenharia Genética nesta mesma publicação. Derivados dos estudos sobre Biologia Molecular surgiram também valiosas tecnologias para a separação de cromossomos, para estudar variabilidade genética e para mapeamento cromossômico, entre outras. Essas técnicas são conhecidas por siglas como CHEF e OFAGE para separação de cromossomos em campo pulsado (38, 39), RFLP, PCR e RAPD para mapeamento genético e para amplificação de segmentos de DNA e estudos de variabilidade. Elas têm permitido um maior conhecimento dos fungos e de outros microrganismos do ponto de vista da sua Genética Molecular, facilitando os processos de melhoramento genético.

3.3.3 – Recombinação em outros microrganismos

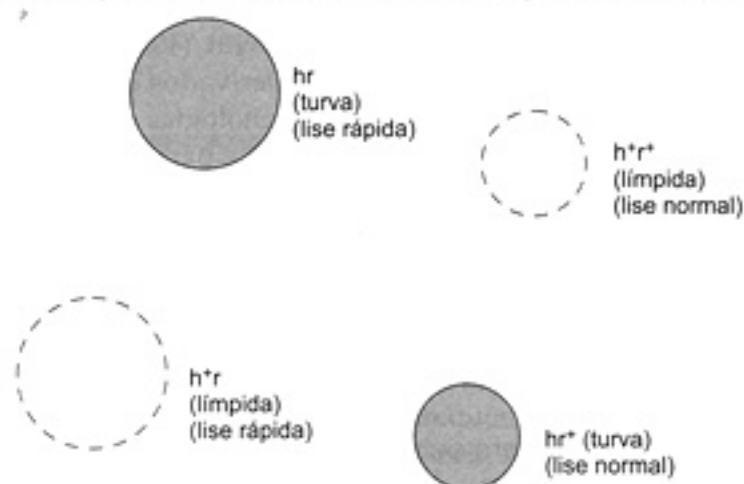
Embora não tão importantes para estudos genéticos ou biotecnológicos, recombinação também se verifica em vírus, algas e protozoários. Resumidamente serão apresentados os principais sistemas de recombinação nos mesmos.

3.3.3.1 – Recombinação nos vírus

Os vírus permitiram, em vários casos, a elucidação de importantes aspectos genéticos, como a decifração do código genético ou estimativas das dimensões dos genes. Os vírus mais empregados são os bacteriófagos. Como já visto, eles têm um papel primordial em um dos processos de recombinação bacteriana, a transdução. Entretanto os bacteriófagos por si só apresentam um

sistema de recombinação. O processo é simples. Infectando-se uma célula bacteriana com duas ou mais linhagens mutantes de fagos, ocorre síntese de DNA no interior das bactérias, que depois de algum tempo sofrem lise e liberam partículas de fagos. Dentre essas partículas, além dos tipos parentais, aparecem recombinantes. Um dos primeiros exemplos de recombinação em fagos foi descoberto por Hershey e Rotman em 1949 (41). Eles infectaram duas linhagens, B e B/2 de *E. coli* com dois tipos de bacteriófagos, o primeiro com genótipo $h+r+$ ($h+$ tem afinidade e ataca as duas linhagens de *E. coli* e $r+$ dá lise normal) e o segundo com genótipo $h-r$ (ataca só uma das linhagens e tem placa de lise rápida e portanto maior que o selvagem $r+$). Apareceram entre as partículas virais que resultaram das células lisadas os dois tipos parentais, além de dois outros tipos, os recombinantes $h+r-$ e $h-r+$ (Fig. 3.20). Experimentos infectando-se bactérias com três tipos de fagos mostraram que recombinantes entre os três tipos podem ser recuperados. Suas frequências são compatíveis com permuta ou "crossing-over" entre eles, sempre dois a dois em vários ciclos ou turnos de recombinação.

Figura 3.20 – Recombinação em vírus. Do cruzamento de vírus com os genes $h+r+$ (placa de lise límpida e peque-



na) com outro $h-r$ (placa de lise turva e grande) resultam os tipos parentais ($h+r+$ e $h-r-$) e os dois tipos recombinantes ($h+r-$ e $h-r+$). A figura representa os fenótipos das placas de lise em *Escherichia coli* linhagens B e B/2 semeadas conjuntamente em placa de Petri.

Os bacteriófagos e outros vírus são também de valor na tecnologia do DNA recombinante, como vetores de genes e como modelos para diferentes experimentos genéticos. Também sua importância aplicada vem sendo cada vez mais acentuada nas áreas de saúde e controle biológico de insetos-pragas da agricultura como é o caso dos baculovírus que são patógenos de importância para pragas como a Lagarta da soja. (2, 34, 42).

3.3.3.2 – Recombinação em protozoários

Foi principalmente após a descoberta de tipos de reação sexual em protozoários que sua genética começou a adquirir certa importância. No entanto, o volume de trabalhos genéticos com eles é muito menor do que com bactérias e fungos. Alguns são razoavelmente bem estudados, principalmente entre os ciliados, como espécies dos gêneros *Paramecium* e *Tetrahymena*. No entanto, a não formação de colônias em meio sólido, a complexidade dos meios de cultivo e conseqüentemente a dificuldade do isolamento de mutantes, limita muito o uso de protozoários em Genética. Nos protozoários ciliados há dois tipos de núcleos, os macronúcleos e os micronúcleos. Na reprodução assexuada há simplesmente um estrangulamento da célula, resultando em duas células filhas. Na reprodução sexuada, exemplificando para a espécie *Tetrahymena pyriformis*, duas células de tipos de reação sexual opostos se conjugam pelo citóstoma, ocorre meiose nos micronúcleos, com a formação de quatro deles em cada célula, dos quais três degeneram. O que restou sofre mitose e dá dois micronúcleos, um dos quais migra para a outra célula, onde se funde com o que lá permaneceu, resultando assim novamente micronúcleos diplóides. O micronúcleo diplóide de cada célula sofre duas mitoses: dá quatro micronúcleos diplóides, dois dos quais vão dar macronúcleos (o que estava na célula degenera). No final resultam células com um micronúcleo e um macronúcleo cada (Fig. 3.21).

O ciclo vital de *Paramecium* como o *P. aurelia* é semelhante. Nessa espécie ocorre um outro tipo de recombinação, chamado de autogamia, que envolve apenas uma célula. Há uma desorganização do macronúcleo, divisão meiótica e depois mitótica do micronúcleo, resultando oito deles dos quais sobra apenas um que se divide. Os dois micronúcleos resultantes fundem-se dando novamente um micronúcleo diplóide e, nesse caso, homozigoto. Resulta assim um só tipo de reação sexual, pois os protozoários que saem de uma reprodução normal por conjugação são heterozigotos para o gene de reação sexual e não podem mais se conjugar. A autogamia restabelece dessa maneira homozigose para o gene de reação sexual, permitindo com que a célula do protozoário possa se conjugar com célula de tipo de reação sexual oposta.

Os protozoários são muito apropriados para estudos genéticos de herança extracromossômica, diferenciação celular, genética do comportamento etc. Uma conjugação em protozoários envolve transferência de um núcleo para um citoplasma inteiramente novo para ele e altamente diferenciado. O macronúcleo parece conter muitas séries cromossômicas que se organizam em grupos diplóides. Um gene mutante que é carregado de um protozoário para outro, raramente se manifesta imediatamente, pois no citoplasma já existe grande quantidade do produto do gene anteriormente presente. Somente após várias divisões celulares é que a característica genética se manifesta (Fig. 3.22).

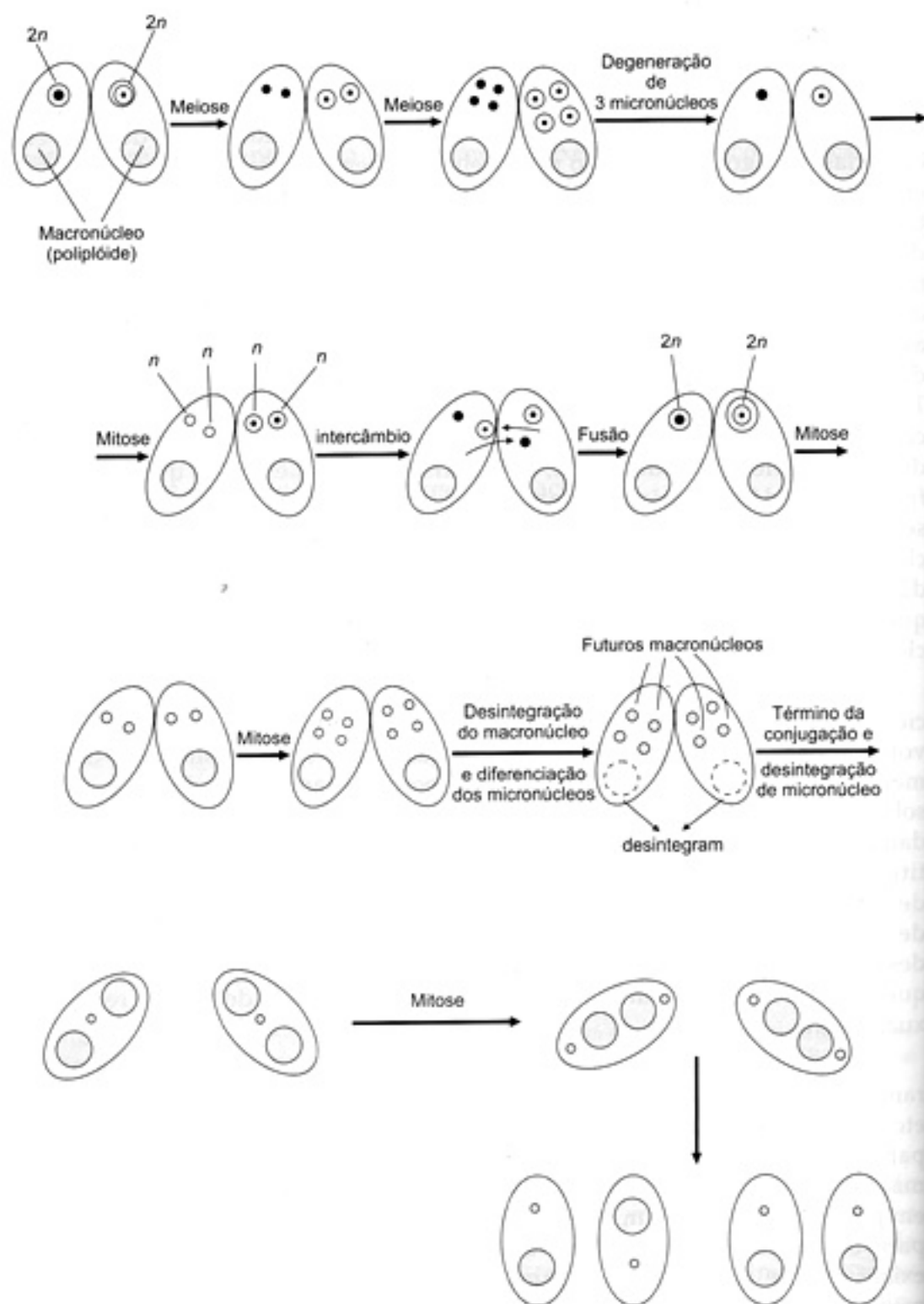


Figura 3.21 – Reprodução sexuada no protozoário *Tetrahymena pyriformis*.

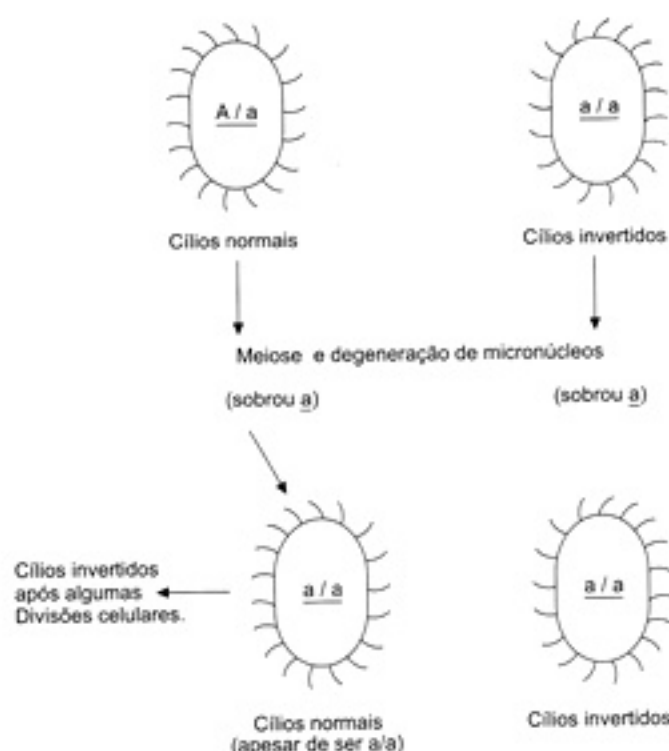


Figura 3.22 – Herança retardada em protozoários ciliados. Apesar de as duas células resultante de um cruzamento terem o mesmo genótipo a/a , elas são fenotipicamente distintas, uma com cílios normais e outra com cílios invertidos. Somente quando o produto do gene A for diluído, o que ocorre somente após algumas divisões celulares, é que os protozoários descendentes de células com cílios normais vão apresentar cílios invertidos.

3.3.3.3 – Recombinação em algas

A exemplo dos protozoários, pesquisas genéticas em algas são também muito menos numerosas que em bactérias e fungos. Os principais exemplos de estudos genéticos estão dentro do grupo das algas verdes ou clorofíceas, sendo a espécie *Chlamydomonas reinhardtii* a mais utilizada. Ela apresenta um sistema de recombinação, a conjugação, onde dois tipos de reação sexual designados de mt^+ e mt^- são conhecidos. Quando duas células de tipos sexuais opostos se encontram, pode resultar fusão celular ou singamia, produzindo-se um zigoto diplóide. O núcleo diplóide do mesmo sofre meiose, dando quatro células haplóides, duas com um tipo de reação sexual e duas com o tipo oposto. A Fig. 3.23 apresenta os passos da conjugação nessa alga. Assim como há segregação de 1:1 para o gene do tipo de reação sexual, outros genes cromossômicos de algas também apresentam o mesmo tipo de segregação. Em *Chlamydomonas* podem ser usados meios definidos, ou seja, de composição simples. Mutantes auxotróficos, morfológicos e para resistência a drogas são empregados, o que facilita a análise genética.

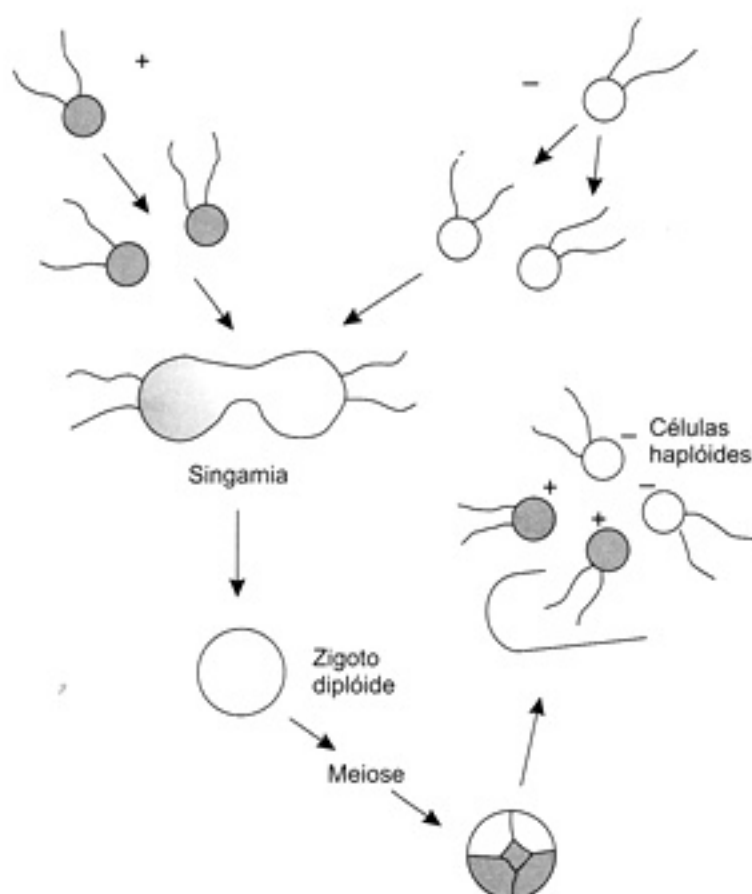


Figura 3.23 – A conjugação na alga *Chlamydomonas reinhardtii*. Células dos tipos de reação sexual $mt+$ e $mt-$ sofrem singamia, dando um zigoto diplóide. Por meiose, quatro células haplóides são formadas, sendo duas $mt+$ e duas $mt-$.

A Genética de algas verdes é rica em exemplos de herança citoplasmática. Algumas dessas algas têm apenas um cloroplasto que contém DNA. Assim, existem genes nucleares e extranucleares ou extracromossômicos que podem ser estudados separadamente. Genes para resistência a antibióticos e para fotossíntese estão localizados, em algas verdes, no DNA dos cloroplastos. Isso torna as algas um atrativo material de estudo de genes localizados em DNA do cloroplasto.

3.4 – Herança extracromossômica em microrganismos

Já foram citados várias vezes neste capítulo que elementos extracromossômicos e portanto, casos de herança extracromossômica, são detectados em microrganismos. Em algas e protozoários os casos são muito frequentes, tornando-os um material apropriado para esse tipo de estudo. Mas é novamente em bactérias e fungos que casos de herança extracromossômica adquirem uma importância toda especial. Alguns deles vão ser citados a seguir.

3.4.1 – Plasmídeos bacterianos

Bactérias podem conter elementos extracromossômicos, designados de plasmídeos. Estes possuem capacidade de se dividir independentemente do cromossomo bacteriano e são constituídos por DNA. Embora bem menores que os cromossomos e não sendo essenciais para a sobrevivência das bactérias que os albergam, pelo menos em certos meios de cultura, os plasmídeos carregam genes que conferem diferentes características genéticas aos seus hospedeiros. Essas características não estão ligadas ao cromossomo bacteriano, a não ser quando o plasmídeo se incorpora ao mesmo, o que pode ocorrer com alguns deles. Esse é o caso do plasmídeo F já mencionado (ver item sobre conjugação bacteriana) e mesmo o bacteriófago λ envolvido na transdução específica e que também pode ser considerado um plasmídeo. Plasmídeos que podem existir no estado autônomo ou integrado ao cromossomo são chamados de episomos e esses estados são reversíveis, como ocorre com o plasmídeo F e no fago λ . Alguns dos principais plasmídeos bacterianos além do F e λ serão descritos a seguir.

3.4.1.1 – Plasmídeos R

Plasmídeos R carregam genes que conferem resistência a diversos tipos de inibidores, como antibióticos, quimioterápicos, sais de metais pesados etc. Eles foram pela primeira vez estudados no Japão, quando constatou-se transferência de resistência múltipla a drogas entre bactérias encontradas em pacientes com desintéria bacteriana. Depois disso, muitos outros casos foram descritos em várias partes do mundo, conferindo a esses plasmídeos grande importância do ponto de vista médico (14).

Os plasmídeos R, à semelhança dos F, podem em sua grande maioria ser transferidos de uma célula para outra, pois têm genes que carregam informações para essa transferência. Porém, além disso, carregam genes que condicionam resistência a vários antibióticos, como penicilinas, tetraciclina, cloranfenicol, e outros, para quimioterápicos como as sulfas e para sais de metais pesados como o mercúrio, por exemplo. O mecanismo de resistência condicionado por esses genes é diferente do da resistência cromossômica. Em geral os genes para resistência, localizados em plasmídeos, carregam informações para produção de enzimas que inativam o antibiótico, ou não permitem a sua entrada nas células. Essas células tornam-se, então, resistentes a vários agentes de uma só vez, causando graves problemas na terapia de germes patogênicos. Por outro lado, esses plasmídeos têm sido usados como vetores de genes na tecnologia do DNA recombinante. Também plasmídeos que carregam resistência a metais pesados, fungicidas e outros agroquímicos, têm sido relatados como de potencial importância para despoluição de ambientes com esses componentes, uma vez que conseguem degradá-los.

3.4.1.2 – Plasmídeos colicinogênicos

Descritos pela primeira vez em *E. coli*, de onde provém seu nome, esses plasmídeos carregam genes para produção de colicinas. Estas são substâncias antimicrobianas de curto espectro que conseguem matar linhagens de bactérias da mesma espécie ou de espécies muito relacionadas. Após sua descoberta em *E. coli*, elas foram também constatadas em muitas outras bactérias, donde esses plasmídeos receberam uma designação mais geral, de bacteriocinogênicos e os agentes antibacterianos, de bacteriocinas. Como no caso dos plasmídeos R, os plasmídeos produtores de bacteriocinas são usados como vetores em Engenharia Genética.

3.4.1.3 – Plasmídeos de *Staphylococcus*

Esse gênero bacteriano é rico em plasmídeos, alguns de grande importância médica, como os plasmídios produtores de penicilinase, enzima que inativa a penicilina, tornando a bactéria que o possui resistente a esse antibiótico. Sabe-se que esses plasmídios podem carregar também outros genes que conferem resistência a arsenato, arsenito, mercúrio, cobre, zinco, neomicina, eritromicina, etc. Várias cópias desses plasmídios podem existir em uma mesma célula. Como os plasmídios R, eles também causam problemas, pois bactérias resistentes são freqüentemente encontradas e sobrevivem ao tratamento com os mais diversos antimicrobianos.

3.4.1.4 – Outros tipos de plasmídeos

Muitos outros tipos de plasmídeos já foram descritos, como os que conferem competência à transformação em algumas bactérias, os que dão características de produção de ácido sulfídrico e os relacionados à patogenicidade. Podem ser encontradas revisões sobre outros tipos de plasmídeos, além dos plasmídeos já mencionados (21, 44). São descritos inclusive plasmídeos crípticos, detectados, por exemplo, por processos eletroforéticos, mas que não produzem aparentemente qualquer diferença fenotípica nas células que os contêm. Não só em bactérias mas em outros seres vivos eles foram detectados. O plasmídeo 2 μ de leveduras é um exemplo. Também o DNA mitocondrial bem como o cloroplastídico, podem ser considerados plasmídeos.

A importância dos plasmídeos é inquestionável para a sobrevivência e evolução de uma espécie, principalmente aquelas que se baseiam em um grande número de indivíduos para resistir a modificações do meio ambiente. É o caso, por exemplo, das bactérias onde a alta variabilidade existente permite que elas sobrevivam aos mais diversos agentes inibidores. Sendo extracromossômica, essa variabilidade não substitui, apenas adiciona novas propriedades às células, permitindo sua adaptação a ambientes adversos. Melhor ainda, podendo ser perdidos facilmente e também recuperados por recombinação, esses elementos extracromossômicos fornecem uma capacidade de rápidas modificações nas populações das espécies que os possuem.

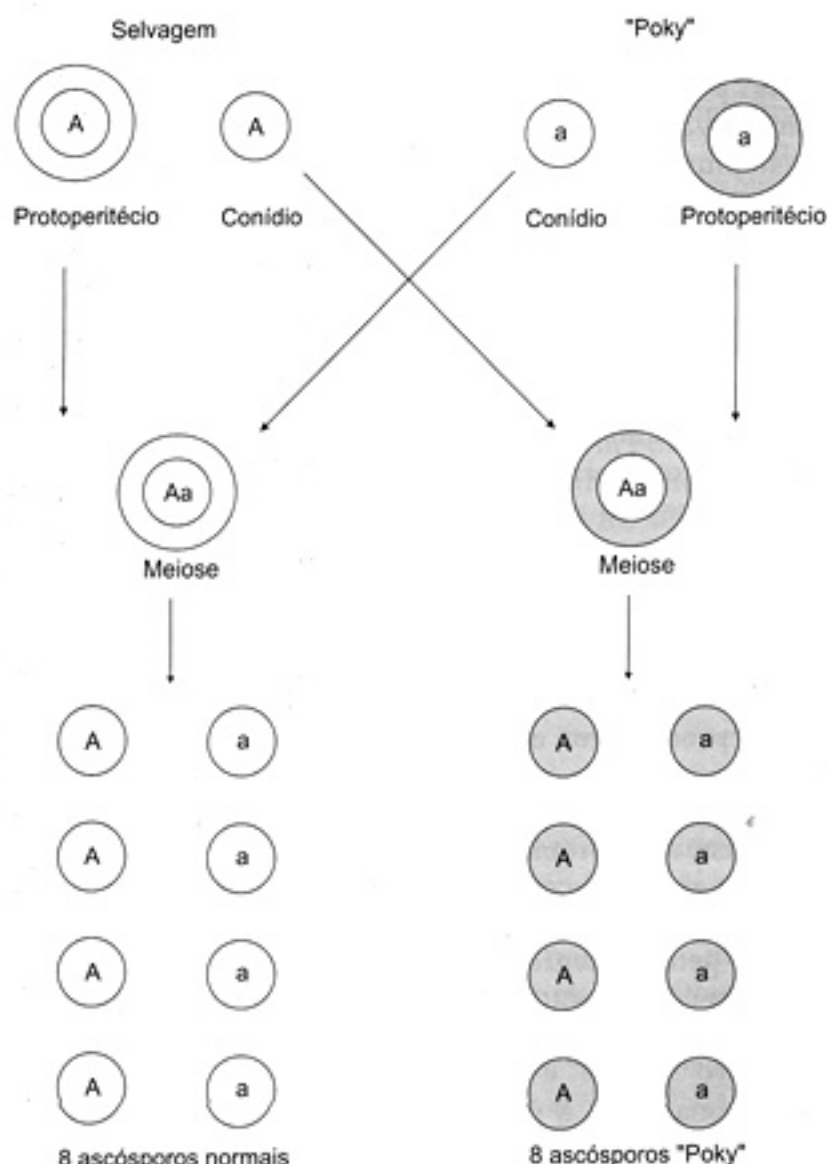


Figura 3.24 – Herança extracromossômica. Mutantes "poky" de *Neurospora crassa*. Os descendentes são sempre iguais à linhagem que forneceu o citoplasma (protoperitécio), independentemente do tipo de reação sexual ou de genes nucleares.

3.4.2 – Herança extracromossômica em fungos

O reino dos fungos também é rico em exemplos de herança extracromossômica ou extranuclear, no caso, pois esses são microrganismos eucarióticos, dotados de núcleo típico. Um exemplo em fungos filamentosos e outro em leveduras vão ser descritos a seguir. Mais exemplos podem ser encontrados em várias revisões, livros e trabalhos a respeito da herança extranuclear em fungos (1, 10, 45, 46, 47).

3.4.2.1 – Colônias "poky" em *Neurospora crassa*

Mutantes "poky" possuem um crescimento reduzido quando comparado com linhagem selvagem ou normal. Esse tipo de mutante é herdado sempre que a linhagem mutante é usada como "mãe", isto é, fornecedora de citoplasma e núcleo, ao contrário da linhagem "pai", que só fornece o núcleo para os descendentes. Uma linhagem que em um cruzamento fornece só o conídeo é uma linhagem que funciona como "pai", enquanto que a outra que entra com hifas para produção dos descendentes é a linhagem "mãe". A Fig. 3.24 apresenta cruzamentos entre *N. crassa* selvagem e "poky", evidenciando herança citoplasmática. Nesse caso a organela extracromossômica que entra com o material genético para dar o caráter normal ou mutante é mitocôndrio. A linhagem usada como "mãe" é a que fornece a grande quantidade de citoplasma, incluindo os mitocôndrios, que vão ser incorporados aos descendentes. É ela portanto que direciona as características dos mesmos, em um caso de herança extracromossômica mitocondrial.

3.4.2.2 – Colônias "Petite" de leveduras

Em culturas, da levedura *Saccharomyces cerevisiae* a semeadura de células em meio sólido produz uma certa frequência de colônias de tamanho pequeno, chamadas de "petite". As células de colônias "petite" têm incapacidade de utilizar oxigênio, por falta ou alteração de enzimas respiratórias, possuindo um metabolismo anaeróbico. Algumas colônias "petite" dão segregação mendeliana normal, isto é, cruzamentos de células normais com "petite" produzem por meiose quatro esporos sexuais, sendo dois de fenótipo normal e dois "petites" ("petites" segregacionais). Entretanto, na maioria dos casos a segregação de um cruzamento normal x "petite" produz os quatro descendentes normais ("petites" neutros) ou quantidades variáveis não mendelianas, chegando a quatro "petites" e nenhum normal ("petites" supressivos). Os mutantes segregacionais têm a mutação localizada no cromossomo e portanto não constituem casos de herança extracromossômica. Os neutros têm falta total de DNA mitocondrial e assim cruzados com células normais têm suas mitocôndrias normais restabelecidas. Os supressivos perderam em diferentes graus parte de seu DNA mitocondrial.

3.4.3 – Critérios para se estabelecer casos de herança extracromossômica

O geneticista, microbiologista e todos os que trabalham com microrganismos devem estar sempre atentos para distinguir entre características genéticas e aquelas que são condicionadas apenas por variações do ambiente. Também devem estar atentos para saber se as características genéticas são regidas por genes cromossômicos ou extracromossômicos, isto porque as primeiras são muito mais estáveis que as extracromossômicas. Embora alta instabilidade em linha-

gens microbianas possa ocorrer devido a fatores nucleares, como aberrações cromossômicas, transposições e outras causas (48, 49, 50), as modificações genéticas extracromossômicas, de modo geral, produzem maior instabilidade, o que se constitui um problema em linhagens industriais. Assim, os critérios para distinção entre herança extracromossômica e cromossômica tornam-se de real valor. Os principais critérios para distinguir os dois tipos de herança são: a) Cruzamentos recíprocos — se uma linhagem mutante é usada como materna e a normal como paterna e vice-versa e, sempre o caráter da linhagem materna é o único a ser transmitido para a descendência há fortes indícios de herança extracromossômica. b) Segregações não mendelianas — se em cruzamentos entre eucariotos via meiose, as segregações mendelianas do tipo 50% com gene normal, 50% com gene mutante não forem obtidas, pode-se suspeitar de herança extracromossômica. c) Teste de heterocário — é muito usado em fungos filamentosos. Nesse teste duas linhagens, uma selvagem e outra mutante são combinadas em um heterocário e os conídios desse heterocário são analisados. A grande maioria deles deve ser novamente dos tipos que formaram o heterocário. Caso contrário deve ter havido alguma influência citoplasmática sugerindo herança não nuclear da característica mutante. d) Células que se multiplicam por fissão binária ou mitoses e ainda assim segregam, produzindo colônias com setores. Embora isso possa ser devido a mutações frequentes, em muitos casos herança extracromossômica pode estar envolvida. e) Indução específica — se um composto químico produz alta frequência de um tipo de mutante, em geral herança extracromossômica é a responsável por isto. Exemplo típico é o caso de indução de mutantes "petite" em leveduras com acridinas. Esse corante pode chegar a produzir 100% de colônias mutantes com fenótipo "petite", após o tratamento de células normais de leveduras. f) Modificações visíveis em organelas do citoplasma ao microscópio eletrônico. Nesse caso não só pode ser caracterizada a modificação extracromossômica, como inclusive ela pode ser relacionada com organelas citoplasmáticas como mitocôndrios e cloroplastos.

3.5 – Considerações finais

A genética microbiana, embora de introdução relativamente recente quando comparada com a genética de plantas e animais superiores, possivelmente já forneceu mais dados para uma maior compreensão da ciência de hereditariedade e biologia molecular do que a contribuição fornecida por todos os outros seres vivos que não os microrganismos. Isso, como citado, foi devido a propriedades que os tornam muito favoráveis para serem usados em estudos genéticos. Somam-se a essas características a facilidade de obtenção dos mais diversos tipos de mutantes e a descoberta dos diferentes sistemas de recombinação como os descritos neste capítulo em fungos, bactérias, algas, protozoários e vírus. Além do mais, a Genética microbiana adquiriu também maior importância após a introdução das técnicas de Engenharia Genética que, em

grande parte, utilizam microrganismos como hospedeiros de genes ou DNAs de microrganismos como vetores para transferência de genes de uma espécie para outra. Finalmente, a introdução cada vez mais freqüente de espécies microbianas em processos biotecnológicos tornam o estudo da Genética de Microrganismos fundamental para que possam ser realizados programas de melhoramento genético cada vez mais eficazes nessas espécies.

Referências bibliográficas

- (1) AZEVEDO, J.L. **Genética de microrganismos**. Goiânia, Ed. Universidade Federal de Goiás, 1998.
- (2) AZEVEDO, J.L. (Coord.). **Genética de microrganismos em biotecnologia e engenharia genética**. Piracicaba, Ed. FEALQ, 1985.
- (3) COSTA, S.O.P. (Coord.). **Genética molecular e de microrganismos**. São Paulo, Manole, 1987.
- (4) HENRIQUES, J.A.P.; QUEROL, C.B. Bases moleculares da mutação. In: COSTA, S.O.P. (Coord.). **Genética molecular e de microrganismos**. São Paulo, Manole, 1987. p.117-134.
- (5) DEMEREC, M.; ADELBERG, E.A.; HARTMAN, P.H. A proposal for a uniform nomenclature in bacterial genetics. **Genetics**, v.54, p.61-76, 1966.
- (6) LEDERBERG, J.; LEDERBERG, E.M. Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. **Journal of Bacteriology**, v.63, p.399-406, 1952.
- (7) SILVEIRA, W.D.; AZEVEDO, J.L. Derivation of auxotrophic mutants from *Metarhizium anisopliae* by the filtration technique. **Revista Brasileira de Genética**, v.7, p.1-8, 1984.
- (8) AZEVEDO, J.L. **Tópicos de genética microbiana e molecular**. **Genética de Procariotos**. Piracicaba, Publ. Instituto de Genética, 1977. v.II.
- (9) AZEVEDO, J.L.; COSTA, S.O.P. **Exercícios práticos de genética**. São Paulo, Cia. Ed. Nacional, 1973.
- (10) BAINBRIDGE, B.W. **Genetics of microbes**. Glasgow, Blackie, 1980.
- (11) BURNETT, J.H. **Mycogenetics**. Londres, John Wiley & Sons, 1975.
- (12) FINCHAM, J.R.S.; DAY, P.R.; RADFORD, A. **Fungal genetics**. Oxford, Blackwell, 1979.
- (13) STRICKBERGER, W.W. **Genetics**. Nova York, MacMillan, 1985.
- (14) AZEVEDO, J.L. Genética de microrganismos. In: BEÇAK, W.; FROTA-PESSOA, O. (Coords.) **Genética médica**. São Paulo, Sarvier, 1973. p.41-65.
- (15) LURIA, S.E.; DELBRUCK, E.M. Mutation of bacteria from virus sensitivity to virus resistance. **Genetics**, v.28, p.491-511, 1943.
- (16) NEWCOMBE, H.B. Origin of bacterial variants **Nature**, Londres, v.164, p.150-151, 1949.
- (17) AVERY, O.T.; MAC LEOD, C.M.; McCARTY, M. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of Pneumococcal types. **Journal Experimental Medicine**, v.79, p.137-158, 1944.
- (18) LEDERBERG, J. & TATUM, E.L. Genetic recombination in *Escherichia coli*. **Nature**, Londres, v.158, p.558, 1946.
- (19) ZINDER, N.D.; LEDERBERG, J. Genetic exchange in *Salmonella*. **Journal of Bacteriology**, v.64, p.679-699, 1952.

- (20) HAYES, W. The mechanism of genetic recombination in *Escherichia coli*. **Cold Spring Harbor Symposia Quantitative Biology**, v.18, p.75-93, 1953.
- (21) SOUZA, E.C. Plasmídios bacterianos. In: COSTA, S.O.P. (Coord.). **Genética molecular e de microrganismos**. São Paulo, Manole, 1987. p.273-289.
- (22) JACOB, F.; MONOD, J. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of protein. **Journal of Molecular Biology**, v.3, p.318-356, 1961.
- (23) GRIFFITH, F. The significance of pneumococcal types. **Journal of Hygiene**, v.27, p.113-159, 1928.
- (24) MORSE, M.L.; LEDERBERG, E.M.; LEDERBERG, J. Transduction in *Escherichia coli* K 12. **Genetics**, v.41, p.142-146, 1956.
- (25) McCLINTOCK, B. The origin and behaviour of mutable loci in maize. **Proceedings of National Academy of Science**, Washington, v.36, p.344-355, 1950.
- (26) AZEVEDO, J.L.; ROPER, J.A. Mitotic non-conformity in *Aspergillus nidulans*: Successive and transposable genetic changes. **Genetical Research**, Cambridge, v.16, p.79-93, 1970.
- (27) AZEVEDO, J.L. Novos sistemas de recombinação em microrganismos. **O Biológico**, v.50, p.115-125, 1986.
- (28) NEWTON, S.M.C. Elementos genéticos móveis em procariotos. In: COSTA, S.O.P. (Coord.). **Genética Molecular e de Microrganismos**. São Paulo, Manole, 1987. p.291-305.
- (29) PONTECORVO, G.; ROPER, J.A. Genetic analysis without sexual reproduction by means of poliploidy in *Aspergillus nidulans*. **Journal of General Microbiology**, v.6, p.7, 1952.
- (30) BONATELLI Jr., R.; AZEVEDO, J.L.; VALENT, G. U. Parasexuality in a citric acid producing strain of *Aspergillus niger*. **Revista Brasileira de Genética**, v.6, p.399-405, 1983.
- (31) BAGALHI, E.; VALADARES, M.C.C.; AZEVEDO, J.L. Parameiosis in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Revista Brasileira de Genética**, v.14, p.261-271, 1991.
- (32) PACCOLA-MEIRELLES, L.D. & AZEVEDO, J.L. Parasexuality in *Beauveria bassiana*. **Journal Invertebrate Pathology**, v.57, p.172-176, 1991.
- (33) AZEVEDO, J.L. Recombinação em fungos filamentosos. In: COSTA, S.O.P. (Coord.). **Genética molecular e de microrganismos**. São Paulo, Manole, 1987. p.393-407.
- (34) AZEVEDO, J.L. Técnicas utilizadas nos processos biotecnológicos envolvendo fungos. In: CONGRESSO SBSP, 9., Ilha Solteira, 1995. **Anais. Sociedade Brasileira de Botânica**, 1995. p.77-87.
- (35) BALL, C. Protoplast fusion in commercially important microorganisms. In: L.S. Nisbett & D.J. Winstanley (Edts.). **Bioactive Microbial Products**. vol 2, Nova York, Academic Press, 1983, p.19-32.
- (36) PEBERDY, J.F.; FERENCZY, L. (Edts.) **Fungal protoplasts**. Nova York, Marcel Dekker, 1985.
- (37) CARRAU, J.L.; AZEVEDO, J.L.; SUDBERY, P; CAMPBELL, D. Methods for recovery fusion products among oenological strains of *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. **Revista Brasileira de Genética**, v.5, p.221-226, 1982.
- (38) PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; AZEVEDO, J.L. Técnicas eletroforéticas para separação de cromossomos de microrganismos. Piracicaba, FEALQ, 1989.
- (39) AZEVEDO, J.L.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A. Melhoramento de fungos de importância na agricultura. In: MELO, L.S.; VALADARES-INGLIS, M.C.; NASS, L.L.; VALOIS, A.C.C. (Coord.) **Recursos genéticos e melhoramento: microrganismos**. Jaguariúna, Ed. EMBRAPA, p. 323-356, 2002.
- (40) LEWIN, B. **Genes VII**. Porto Alegre, Artmed Ed., 2001.

- (41) HERSHEY, A.P.; ROTMAN, R. Genetic recombination between host-range and plaque type mutants of bacteriophage in single bacterial cells. *Genetics*, v.34, p.44-71, 1949.
- (42) AZEVEDO, J.L. Engenharia genética no controle biológico de insetos. In: ALVES, S.B. (Coord.). *Controle microbiano de insetos*. Piracicaba, FEALQ, 1996.
- (43) AZEVEDO, J.L.; FUNGARO, M.H.P.; VIEIRA, M.L.C. Transgênicos e evolução dirigida. *História, ciência e saúde-Manguinhos*. V.7, p. 451-464, 2000.
- (44) PERLIN, M.H. Plasmids other than F. In: STREIPS, Y.N.; YASBIN, R.E. (Edts.). *Modern microbial genetics*. Nova York, Willey-Liss., 1991. p.123-155.
- (45) JINKS, J.L. *Extrachromosomal inheritance*. New Jersey, Prentice Hall, 1964.
- (46) ROSATO, Y.B.; AZEVEDO, J.L. A compact variant of cytoplasmatic origin in *Aspergillus nidulans*. *Transactions of the British Mycological Society*, v.75, p.313-315, 1980.
- (47) ROSATO, Y.B.; AZEVEDO, J.L. Mitotic instability of a compact mutant of *Aspergillus nidulans*. *Revista Brasileira de Genética*, v.10, p.425-433, 1987.
- (48) AZEVEDO, J.L. Altered instability due to genetic changes in a duplication strain of *Aspergillus nidulans*. *Genetical Research*, Cambridge, v.26, p. 55-61, 1975.
- (49) BALL, C.; AZEVEDO, J.L. Genetic instability in parasexual fungi In: MACDONALD, K.D. (Ed.). *Second International Symposium of Genetic of Industrial Microorganisms*, Nova York, Academic Press, 1976. p.243-251
- (50) NEWMAYER, D.; TAYLOR, C.W. A pericentric inversion in *Neurospora* with unstable duplication progeny. *Genetics*, v.56, p.771-791, 1967.

4

ELEMENTOS DE ENGENHARIA GENÉTICA

Ana Clara G. Schenberg

4.1 – Introdução

O surgimento da Engenharia Genética, na década de 70, foi uma decorrência natural da grande quantidade de conhecimentos que vinham se acumulando na área de Biologia Molecular, envolvendo principalmente as bactérias e seus vírus. Entretanto, em contraste com os demais progressos verificados nesta área, o advento da Engenharia Genética teve um impacto formidável sobre a Biotecnologia. Hoje, o homem pode intervir diretamente sobre os comandos da vida: é possível programar geneticamente os organismos vivos, não apenas para a superprodução de algum metabolito, mas, ainda, de substâncias que só são normalmente produzidas por outros organismos. Pela facilidade de manipulação que proporcionam, os microrganismos foram os primeiros a serem empregados como hospedeiros da informação genética heteróloga. Em princípio, qualquer proteína pode assim vir a ser produzida em fermentações industriais, desde que o gene que a codifica seja enxertado num microrganismo (ou, em outras palavras, clonado) e passe a ser por ele expressado. De crucial importância é a possibilidade que a nova tecnologia trouxe de amplificar seqüências individuais de DNA: a clonagem de um dado fragmento de DNA permite que, partindo-se de apenas uma molécula, sejam produzidas quantidades ilimitadas desta mesma molécula. Depois que um fragmento de DNA tiver sido assim isolado e amplificado, as suas propriedades podem ser caracterizadas e a sua seqüência de nucleotídeos determinada com precisão, o que proporcionou um progresso vertiginoso do conhecimento básico. Por outro lado, a relevância biotecnológica decorre do fato de que a síntese de proteínas estrangeiras pelos microrganismos leva a uma importante redução dos custos de produção. Para citar apenas um exem-

plo, para produzir, pelas vias tradicionais, 5 mg de somatostatina, um hormônio de vertebrados, são necessários 500.000 cérebros de carneiro. Quando se conseguiu, por meio da Engenharia Genética, enxertar o gene da somatostatina na bactéria *Escherichia coli*, o mesmo rendimento foi alcançado com apenas 7,5 kg de bactérias, o que se obtém de maneira rápida e pouco dispendiosa.

Chama-se de Engenharia Genética ao conjunto de técnicas que tornam possível a criação de novas combinações gênicas, inexistentes na natureza. A recombinação genética consiste na formação de novas combinações estáveis de genes, provenientes de diferentes organismos, podendo, em consequência, surgir novos fenótipos. Entretanto, na natureza, a recombinação genética somente ocorre entre organismos de uma mesma espécie ou de espécies muito proximamente relacionadas. A Engenharia Genética, também conhecida sob o nome de Tecnologia do DNA Recombinante, permite que contrariemos a natureza no que se refere à recombinação genética. Tornou-se possível construir novas espécies de material genético, através da recombinação realizada artificialmente no laboratório entre moléculas de DNA isoladas de organismos não relacionados. Hoje em dia, as possibilidades de manipulação do material genético em tubo de ensaio (*in vitro*) são praticamente ilimitadas: costuma-se dizer que a única limitação reside na capacidade imaginativa do pesquisador.

Em 1972, numa experiência que viria a revolucionar toda a pesquisa biológica e criar perspectivas inéditas para a Biotecnologia, PAUL BERG e seus colaboradores⁽¹⁾ demonstraram que era possível cortar *in vitro* moléculas de DNA de diferentes origens e ligar os fragmentos resultantes entre eles, obtendo assim moléculas híbridas de DNA, inexistentes na natureza. Essa experiência pioneira foi realizada por intermédio de diversas manipulações genéticas e bioquímicas, que se tornaram viáveis graças a uma série de descobertas, que ocorreram em rápida sucessão nos 5 anos que antecederam a experiência de Paul Berg. Entretanto, não faria sentido guardar o novo DNA no tubo de ensaio. Na verdade, a Engenharia Genética pressupõe uma segunda etapa, *in vivo*, que consiste na introdução do material genético construído artificialmente (DNA recombinante) numa célula viva, onde ele possa se manifestar. Essa etapa de transformação genética é mais delicada, não sendo poucos os problemas que o DNA montado *in vitro* terá que enfrentar no interior da célula viva. Para que tenha realmente um significado biológico, é necessário que o DNA recombinante seja não apenas mantido ao longo das divisões celulares da célula originalmente transformada, mas, ainda, transcrito e traduzido na proteína que codifica e, em muitos casos, o produto do gene estrangeiro deverá ainda sofrer passos adicionais de processamento pós-traducional na célula hospedeira.

Como esquematizado na Fig. 4.1, são essencialmente necessários quatro passos para uma experiência desse tipo:

- 1) Um método para clivar e voltar a ligar *in vitro* diferentes moléculas de DNA, originando a molécula de DNA recombinante;

2) Um elemento transportador de genes, o vetor genético, que, ao ser multiplicado pela célula hospedeira, possibilitará que o gene estrangeiro que transporta também o seja;

3) Um meio de introduzir o vetor numa célula viva, capaz de multiplicá-lo;

4) Uma maneira de selecionar, dentre uma grande população de células, apenas aquelas que tiverem efetivamente incorporado o DNA recombinante.

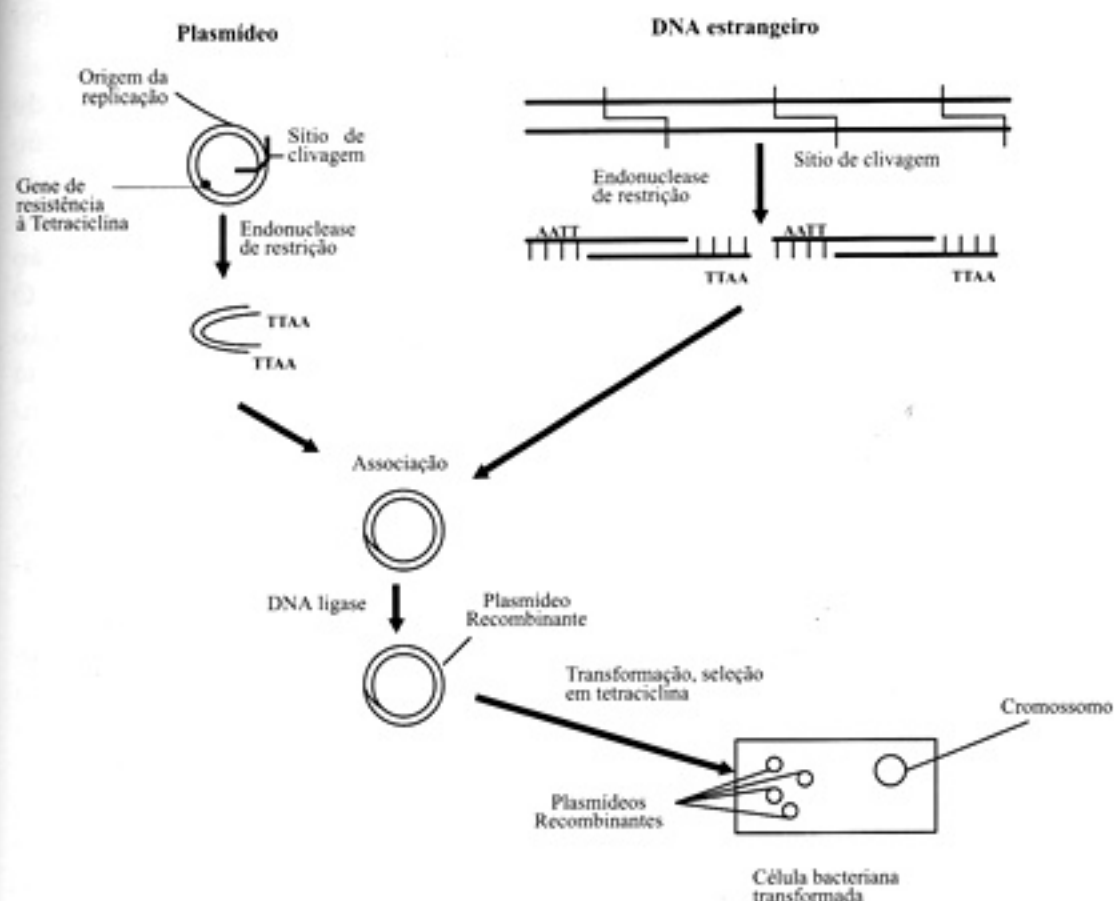


Figura 4.1 – Esquema geral de um experimento de Engenharia Genética. Num tubo de ensaio, o círculo de DNA de dupla fita que constitui o vetor é clivado por tratamento com uma endonuclease de restrição, para a qual apresenta um único sítio suscetível, originando uma molécula de DNA linear. Num 2.º tubo de ensaio, o DNA que se deseja clonar é fragmentado por meio de tratamento com a mesma enzima de restrição, para a qual contém vários sítios suscetíveis. Em seguida, as duas preparações de DNA são reunidas num único tubo, ao qual se acrescenta a enzima DNA ligase, o que resultará na formação de moléculas circulares recombinantes, compostas do DNA do vetor e de um fragmento do DNA estrangeiro. Essa preparação é então empregada para transformar uma linhagem bacteriana sensível ao antibiótico tetraciclina, para o qual o vetor confere resistência. Ao serem semeadas em presença de tetraciclina, somente crescerão as células que contiverem o vetor. Ao se multiplicar, essas células irão originar uma população de células-filhas idênticas (clone), todas portadoras do DNA recombinante.

4.2 – Enzimas de restrição: as tesouras moleculares que cortam a molécula de DNA em pontos específicos

A construção do DNA recombinante requer que seja possível cortar as moléculas de DNA de modo preciso e reprodutível. Além de ser necessário cortar o vetor num único ponto específico, onde será inserido o DNA estrangeiro, é imprescindível que *todas* as moléculas do vetor sejam cortadas exatamente na mesma posição. Conseqüentemente, não se pode realizar esse tipo de construção através da clivagem aleatória do DNA do vetor. Na verdade, a Engenharia Genética só se tornou possível após a descoberta de uma classe especial de enzimas, as endonucleases de restrição, que rendeu o Prêmio Nobel a W. Arber, H. Smith e D. Nathans em 1978.

A observação inicial do fenômeno de restrição tinha sido feita cerca de 30 anos antes por LURIA e HUMAN⁽²⁾, que haviam descrito a capacidade que algumas cepas da bactéria *E. coli* apresentam de se proteger da infecção por bacteriófagos, ou, nas palavras desses autores, de *restringir* o crescimento do bacteriófago. Hoje se sabe que tal mecanismo de defesa consiste na produção pela bactéria de uma enzima capaz de degradar o DNA viral invasor. O DNA próprio da bactéria fica protegido do ataque pela enzima de restrição porque, ao mesmo tempo em que produz a enzima de restrição, a bactéria também produz uma enzima de modificação, pela ação da qual são acrescentados grupos metila a algumas das bases que compõem a sequência de DNA que é reconhecida pela enzima de restrição em questão. Uma vez metilada, essa sequência deixa de ser reconhecida pela enzima de restrição. Assim, para uma determinada enzima de restrição, existe uma enzima de modificação correspondente e fala-se em sistemas de restrição-modificação.

As endonucleases de restrição são sintetizadas por muitas, senão todas, as espécies de bactérias, sendo comum uma mesma espécie bacteriana produzir mais de uma enzima de restrição, mas tais enzimas nunca foram encontradas em organismos eucarióticos. Essa classe de enzimas compreende três tipos, que diferem quanto à genética e enzimologia. As enzimas de restrição de Tipo I e Tipo III têm um modo de ação mais complexo e não são de utilidade em Engenharia Genética. Em contrapartida, sem as enzimas de restrição de Tipo II, não teria sido possível a Engenharia Genética. Assim, daqui por diante, quando falarmos em enzimas de restrição, estaremos nos referindo àquelas de Tipo II.

As enzimas de restrição são endodesoxiribonucleases, ou endonucleases, que reconhecem sequências específicas de nucleotídeos na molécula de DNA e cortam as duas cadeias de DNA num ponto dentro desta sequência. Uma determinada enzima de restrição irá catalisar a quebra da dupla fita apenas quando encontrar aquela sequência particular que reconhece. É essa

especificidade que faz das enzimas de restrição instrumentos tão importantes em Engenharia Genética. Assim, por exemplo, a enzima de restrição chamada *PvuI* (produzida pela bactéria *Proteus vulgaris*) corta o DNA somente quando encontra uma sequência de 6 nucleotídeos CGATCG. Por sua vez, a enzima de restrição *PvuII*, produzida pela mesma bactéria, só corta o DNA quando encontrar uma sequência hexanucleotídica CAGCTG. A maioria das enzimas de restrição reconhece sequências hexanucleotídicas, mas há também algumas, que reconhecem sequências de 4 a 12 nucleotídeos.

Admitindo que os 4 diferentes nucleotídeos ocorram com a mesma frequência ao longo da molécula de DNA, calcula-se que uma dada sequência de 4 pares de bases (bp) ocorra em média a cada 256 bp ($0,25^4 = 1/256$), enquanto uma de 6 bp ocorra a cada 4.096 bp da molécula. Entretanto, como a distribuição de sítios de reconhecimento não é regular, uma determinada região do DNA pode ser cortada mais, ou menos, frequentemente do que a média estatística. Os diferentes fragmentos originados pela digestão com uma enzima de restrição podem facilmente ser separados uns dos outros, com base no seu tamanho, através de eletroforese em gel de agarose ou de poliacrilamida. A partir desses dados, é possível construir o que se chama de *mapa de restrição*, o que envolve a determinação da posição e da orientação de cada fragmento na molécula de DNA original.

As sequências de reconhecimento no DNA apresentam uma simetria rotacional. Em geral, a sequência de reconhecimento constitui um palíndromo, isto é, as 2 fitas têm a mesma sequência, se uma é lida da esquerda para a direita e a outra, da direita para a esquerda (ou, em termos de DNA, se ambas são lidas na direção 5' para 3' ou ambas são lidas na direção 3' para 5'). As sequências de reconhecimento de algumas enzimas de restrição estão apresentadas na Tabela 4.1.

A primeira enzima de restrição foi isolada em 1970⁽³⁾ e hoje já se conhecem mais de 2.500, isoladas a partir de uma vasta gama de espécies bacterianas, compreendendo 230 diferentes sequências de reconhecimento. Em muitos casos, duas ou mais enzimas de restrição, provenientes de diferentes bactérias, reconhecem a mesma sequência de DNA: essas enzimas são chamadas de isoesquizômeros. Hoje, encontram-se disponíveis comercialmente aproximadamente 170 diferentes enzimas de restrição.

O resultado do corte pode ser diferente, segundo a enzima de restrição. Há enzimas que cortam exatamente no meio da sequência de reconhecimento, como é o caso da *PvuII* e da *AluI* (ver Tab. 4. 1), originando o que se chama de extremidade cega ou abrupta nos fragmentos de DNA resultantes da sua ação. Por outro lado, um número considerável de enzimas de restrição corta a dupla fita de maneira a gerar *extremidades coesivas* nos fragmentos resultantes.

Tabela 4.1 – Enzimas de restrição. Estão apresentadas algumas endonucleases de restrição e as seqüências de DNA que reconhecem. A, T, G e C representam os nucleotídeos de adenina, timina, guanina e citosina, respectivamente. As flechas indicam o ponto em que a enzima cliva cada uma das fitas dentro da seqüência de reconhecimento. Notar que o resultado final é sempre uma quebra de fita dupla.

ORGANISMO PRODUTOR	NOME DA ENZIMA	SEQÜÊNCIA DE RECONHECIMENTO	CARACTERÍSTICAS RELEVANTES
<i>Escherichia coli</i>	<i>EcoRI</i>	5'...G↓A A T T C...3' 3'...C T A A↑G...5'	Seqüência palindrômica de 6 nucleotídeos. O corte gera extremidades coesivas.
	<i>EcoRII</i>	5'...↓C C ^A _T G G...3' 3'...G G ^A _T C C↑...5'	Seqüência não palindrômica. O corte gera extremidades coesivas.
<i>Proteus vulgaris</i>	<i>PvuII</i>	5'...C A G↓C T G...3' 3'...G T C↑G A C...5'	O corte gera extremidades abruptas ou cegas.
<i>Arthrobacter luteus</i>	<i>AluI</i>	5'.....A G↓C T.....3' 3'.....T C↑G A.....5'	Seqüência de 4 nucleotídeos. Extremidades cegas.
<i>Anabaena variabilis</i>	<i>AvaI</i>	5'..C↓Py C G Pu G..3' 3'..G Pu G C Py↑C..5'	Qualquer purina (Pu) ou pirimidina (Py) pode estar presente.
<i>Nocardia otitidiscaviarum</i>	<i>NotI</i>	5'.G C↓G G C C G C.3' 3'.C G C C G G↑C G.5'	Seqüência de 8 nucleotídeos, pouco freqüente no DNA de mamíferos.
<i>Providencia stuartii</i>	<i>PstI</i>	5'...C T G C A↓G...3' 3'...G↑A C G T C...5'	Extremidades coesivas com extensão de fita simples em 3'.
<i>Bacillus stearothermophilus ET</i>	<i>BstEII</i>	5'..G↓G T N A C C..3' 3'..C C A N T G↑G..5'	Onde N pode ser qualquer purina ou pirimidina. Uma das raras enzimas que produz extensões de mais de 4 bases.

Isso ocorre porque tais enzimas não cortam as duas fitas da molécula de DNA topo a topo, mas cortam de um modo “desencontrado” dentro da seqüência de reconhecimento, o que produz extremidades de corte dotadas de curtas seqüências de fita simples, complementares entre si, como está mostrado para o caso da enzima *EcoRI* na Fig.4.2.

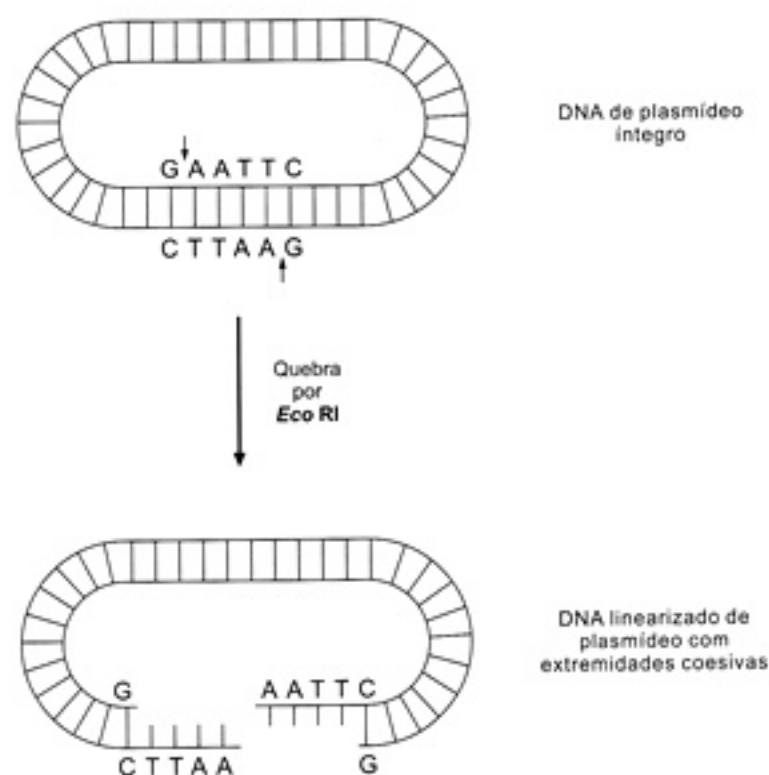


Figura 4.2 – Digestão de DNA pela enzima de restrição Eco RI. Uma molécula de DNA circular de dupla fita contendo apenas uma sequência de reconhecimento para a endonuclease de restrição Eco RI, após tratamento com esta enzima, será convertida numa molécula linear com extremidades coesivas do tipo Eco RI.

Assim, por menor que seja a semelhança entre as seqüências de nucleotídeos de duas moléculas de DNA, a enzima de restrição saberá encontrá-la e cortará ambas as moléculas neste ponto. Fragmentos originados a partir de moléculas de DNA diferentes, porém digeridas pela mesma enzima de restrição, quando dotados de extremidades coesivas, irão se associar com grande facilidade através da complementaridade de seqüência, como mostrado na Fig. 4.1.

Todas as enzimas de restrição clivam a ligação fosfodiéster, deixando grupos 5' fosfato (5' P) e 3' hidroxila (3' OH) nos fragmentos resultantes, que constituem exatamente o substrato da enzima *DNA ligase*. Assim, os fragmentos gerados por ação de uma enzima de restrição poderão ser facilmente reunidos através de ligação covalente, por adição da *DNA ligase*, que catalisa a formação de novas ligações fosfodiéster. Também é possível realizar a ligação entre fragmentos de DNA dotados de extremidades abruptas (como, por exemplo aquelas geradas pela digestão com a enzima de restrição *PvuII*), empregando-se a *DNA ligase* produzida por *E. coli* infectada pelo bacteriófago T4. O modo de ação da *DNA ligase* de *E. coli* e o

da DNA ligase de T4 são muito semelhantes, diferindo entretanto quanto ao co-fator requerido: Enquanto a DNA ligase de *E. coli* requer NAD^+ , a de T4 requer ATP.

Apesar da facilitação que se obtém para a etapa de ligação, quando se utiliza a mesma enzima de restrição para ambas as espécies de DNA a serem recombinadas, surgem também alguns inconvenientes. Como, por exemplo, uma extremidade *EcoRI* vai ser capaz de se emparelhar com qualquer outra extremidade *EcoRI*, no momento em que a enzima DNA ligase for adicionada ao sistema, algumas moléculas do vetor irão se recircularizar através da reação entre as suas 2 extremidades, sem que tenha ocorrido nenhuma inserção de DNA estrangeiro. Por outro lado, também irão se formar moléculas híbridas, contendo inserções de vários fragmentos do DNA estrangeiro religados entre eles através das suas extremidades *EcoRI*. Como mostrado na Fig. 4.3, a recircularização do plasmídeo pode ser evitada, se, antes da etapa da DNA ligase, o plasmídeo linearizado for submetido à ação da enzima fosfatase alcalina, que remove os fosfatos das extremidades 5' da molécula, impedindo em consequência a ação da DNA ligase, cujo substrato é constituído de extremidades 5'P e 3'OH. Assim, quando as 2 espécies de DNA a serem recombinadas forem postas em presença uma da outra e da DNA ligase, as extremidades 5'P dos fragmentos do DNA estrangeiro serão ligadas às extremidades 3'OH do plasmídeo, numa das fitas. Na outra fita, sobrará uma interrupção, porque tampouco poderá ocorrer a ligação entre as extremidades 3'OH do DNA estrangeiro com o plasmídeo, mas a célula bacteriana é capaz de reparar tais interrupções de fita simples, de modo que, uma vez dentro da célula, o plasmídeo recuperará a sua integridade conformacional. Outras alternativas existentes para contornar o problema da recircularização do vetor serão explicadas mais adiante.

4.3 – Vetores genéticos: as moléculas de DNA que veiculam a propagação dos fragmentos de DNA de interesse

Um vetor genético nada mais é que uma molécula de DNA, que pode aceitar introduções de DNA estrangeiro em regiões não essenciais para a sua multiplicação dentro da célula hospedeira. Tais moléculas de DNA serão, portanto, as transportadoras do DNA heterólogo para o interior da célula hospedeira, possibilitando a sua multiplicação, sob a forma de uma molécula híbrida. É desejável que o DNA do vetor possa ser extraído em separado do DNA cromossômico do hospedeiro, para facilitar que se recupere o DNA estrangeiro inserido neste vetor. Entre as bactérias, são frequentemente encontrados elementos genéticos extracromossômicos, tais como plasmídeos e vírus (bacteriófagos), que preenchem esses requisitos. Podemos dizer que a Engenharia Genética só se tornou realidade porque plasmídeos e vírus bacterianos se mostraram capazes de reprodução após a adição de seqüências de DNA estrangeiras ao seu genoma.

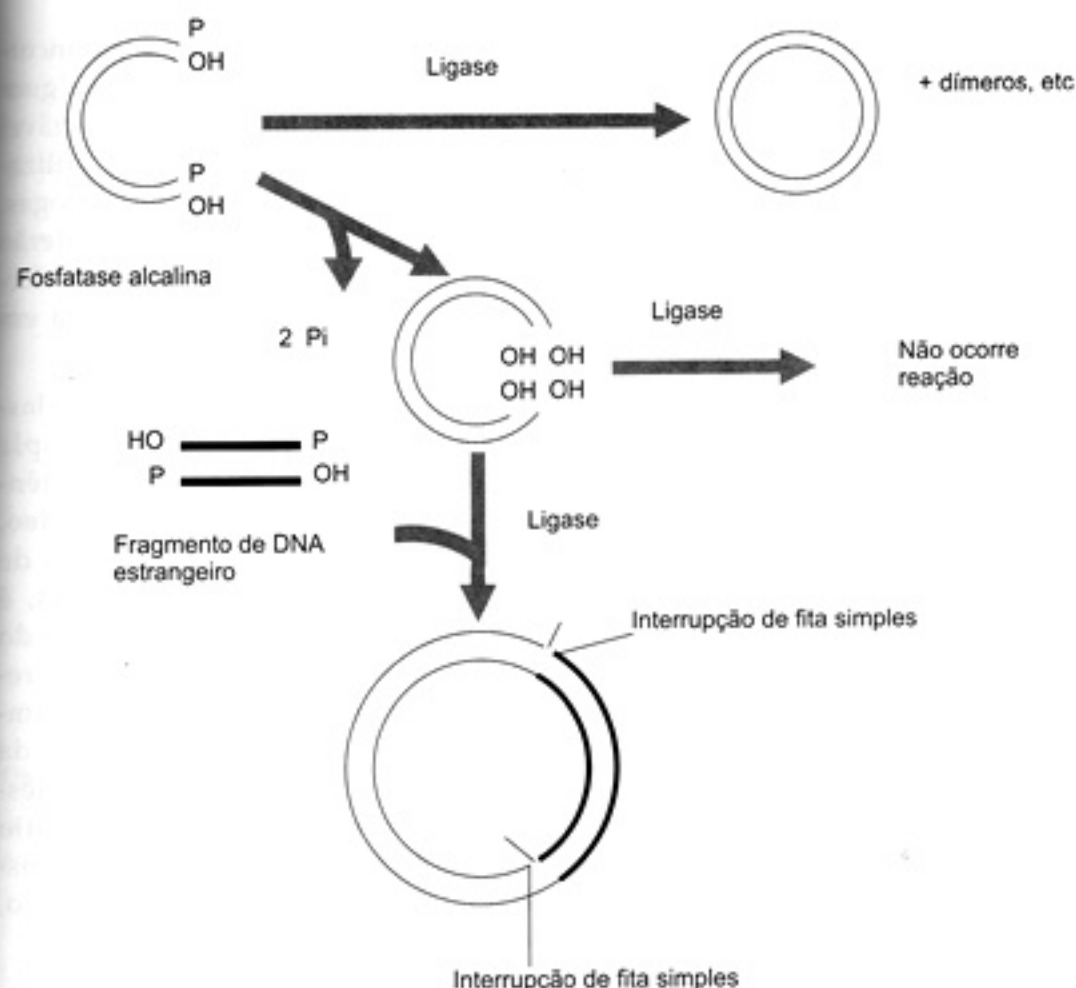


Figura 4.3 – Desfosforilação do vetor. Para evitar que se recircularize sem nenhuma inserção de DNA estrangeiro, o DNA do plasmídeo linearizado é primeiramente submetido à ação da enzima fosfatase alcalina, antes de ser posto em presença do fragmento de DNA estrangeiro e da DNA ligase.

Para que o DNA recombinante possa perpetuar-se entre os descendentes da célula viva que o recebeu inicialmente, ou, em outras palavras, para que o DNA recombinante possa ser *clonado*, é preciso que o sistema enzimático de síntese de DNA (processo de replicação do DNA) desta célula reconheça o novo DNA. Para tanto, é necessária a presença, no vetor, de uma sequência correspondente a uma origem de replicação compatível com o sistema de síntese de DNA da célula hospedeira. Plasmídeos e bacteriófagos contêm tais origens de replicação e apresentam portanto replicação autônoma, independente do cromossomo da célula. Sendo replicados normalmente pela célula hospedeira, haverá cópias de tais replicons em todas as células do clone que esta célula irá originar ao fim de sucessivas divisões.

Por outro lado, para que aquelas células que tiverem efetivamente incorporado o novo DNA possam ser identificadas, o replicon deve conter algum gene que confira às células uma nova característica, facilmente detectável (marcador genético). Os marcadores genéticos mais freqüentemente utilizados para a manipulação de bactérias são os genes de resistência a drogas. Assim, das milhares de bactérias submetidas ao agente infeccioso, poderão ser facilmente selecionadas aquelas poucas que tiverem realmente sido infectadas, através de uma simples semeadura sobre meio contendo a droga em questão, à qual as células eram originalmente sensíveis.

O primeiro vetor a ser utilizado em Engenharia Genética foi o plasmídeo pSC101, um pequeno círculo extracromossômico de DNA de dupla fita, natural da bactéria *E. coli*, portador de um gene que confere resistência ao antibiótico tetraciclina. COHEN *et al.*⁽⁴⁾ utilizaram esse plasmídeo, porque ele continha apenas um sítio de reconhecimento para a enzima de restrição *EcoRI* e, conseqüentemente, após digestão por esta enzima, é convertido numa molécula linear, dotada de extremidades coesivas do tipo *EcoRI*. Quando essa molécula de DNA linearizada foi posta em presença de diferentes fragmentos de DNA de outra procedência, porém também obtidos por digestão pela *EcoRI*, e esta mistura submetida à ação da DNA ligase, formaram-se diferentes plasmídeos híbridos. Cada um desses continha um ou mais pedaços do DNA estrangeiro inseridos no sítio de *EcoRI* do plasmídeo recircularizado e se mostraram capazes de transformar uma linhagem selvagem da bactéria *E. coli*, sensível ao antibiótico, numa linhagem resistente ao antibiótico.

A partir dos plasmídeos naturais de bactérias, foram a seguir derivados novos plasmídeos, mais adequados para servir como vetores de clonagem. O mais conhecido desses plasmídeos artificiais é o pBR322⁽⁵⁾, um pequeno plasmídeo multicópias, de 4.363bp, construído a partir de fragmentos provenientes de vários plasmídeos naturais de *E. coli* (Fig. 4.4). A sua origem de replicação provém do plasmídeo ColE1, cujo número de cópias por célula é normalmente 15, mas que pode ainda ser amplificado até 3.000 cópias/célula, através da adição de cloranfenicol à cultura. Ocorre que a replicação desse tipo de plasmídeo está sob controle dito relaxado, de tal modo que, embora a maquinaria de replicação de DNA e de síntese protéica da célula hospedeira seja inibida pelo cloranfenicol, a replicação do plasmídeo ainda continua por várias horas após a adição da droga. Além da origem de replicação do plasmídeo ColE1, o plasmídeo pBR322 contém 2 marcadores de seleção, *Amp^R* e *Tet^R* (genes de resistência à ampicilina e tetraciclina), e apresenta 39 sítios únicos de reconhecimento para diferentes enzimas de restrição, alguns dos quais situados inclusive dentro destes marcadores.

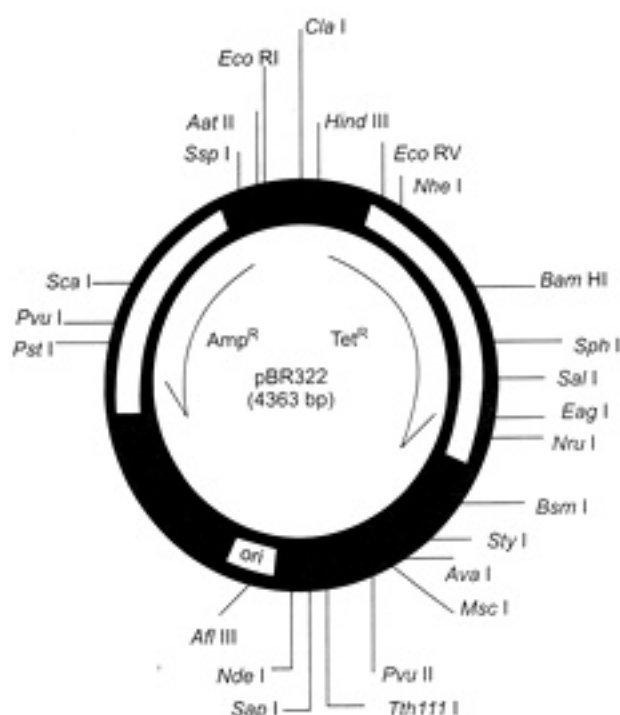


Figura 4.4 – Plasmídeo pBR322. Molécula circular de DNA de dupla fita, contendo uma origem de replicação (*ori*) e 2 genes marcadores, *Amp^R* e *Tet^R*, que conferem resistência aos antibióticos ampicilina e tetraciclina, respectivamente. Estão indicados alguns dos sítios únicos de reconhecimento para diferentes enzimas de restrição. As flechas indicam a direção de transcrição dos genes marcadores.

Como se pode observar pela Fig. 4.4, se utilizarmos o sítio *Pst*I para a inserção do DNA estrangeiro, o gene *Amp^R* ficará inativado e, conseqüentemente, a bactéria transformada por este plasmídeo recombinante ficará resistente apenas à tetraciclina, porém continuará sensível à ampicilina (fenótipo *Amp^S Tet^R*). Como as células não transformadas tem fenótipo *Amp^S Tet^S*, será possível distinguir de imediato, num teste em placa de Petri (basta semear as células sobre meio completo adicionado do antibiótico), as células não transformadas das células transformadas pelo plasmídeo recombinante e, ainda mais importante, daquelas transformadas por um plasmídeo não recombinante, ou seja, em que não ocorreu inserção do fragmento estrangeiro: Essas últimas serão resistentes aos dois antibióticos (*Amp^R Tet^R*). A possibilidade de tal inativação insercional, acarretando um fenótipo facilmente reconhecível, que resulta da presença de dois genes de resistência contendo sítios de clonagem diferentes, fez do pBR322 um instrumento extremamente útil em Engenharia Genética. Posteriormente, foram construídos plasmídeos ainda mais aperfeiçoados para desempenhar o papel de vetores de *E. coli*. Assim, por exemplo, o plasmídeo pUC18 contém um grande número de sítios únicos para diferentes enzimas de

restrição, todos reunidos numa única região, que foi denominada de polylinker. Como o polylinker está situado dentro do gene *lacZ*, uma inserção de DNA estrangeiro em qualquer um dos sítios do polylinker irá acarretar a inativação insercional do gene *lacZ*. Semeando-se as células em meio contendo o indicador X-Gal, as colônias transformadas pelo plasmídeo recombinante podem ser facilmente reconhecidas, uma vez que passam da coloração azul para branca. Uma vantagem adicional, proporcionada pelo polylinker, consiste na possibilidade de se inserir diretamente um fragmento com extremidades geradas por duas diferentes enzimas de restrição (desde que existam sítios para elas no polylinker), sem ter que recorrer a manipulações adicionais.

Por outro lado, foram também desenvolvidos sistemas de clonagem para bactérias, empregando bacteriófagos ao invés de plasmídeos. Esses sistemas proporcionam maior facilidade de isolamento das moléculas híbridas, pois, permitindo-se ao fago concluir o seu ciclo lítico, serão liberadas partículas fágicas contendo o DNA recombinante (obtem-se facilmente uma amplificação de 10^6 vezes no lisado). Entretanto, haverá um limite de tamanho para o DNA que se deseja clonar, já que só poderá ser empacotada na cabeça do fago uma molécula de DNA de um determinado comprimento. Os bacteriófagos têm aproximadamente de 10 a 50 genes e podem ser manipulados para transportar outros genes em substituição a alguns dos seus. Assim, puderam ser construídos vetores, consistindo do genoma do bacteriófago lambda, do qual se removeu uma região não essencial para o desenvolvimento do ciclo lítico, que pode portanto ser substituída pelo DNA estrangeiro. Essa abordagem apresenta ainda a vantagem de que o DNA do fago sem a inserção será pequeno demais para ser empacotado e, conseqüentemente, só serão geradas partículas fágicas contendo o DNA recombinante, contanto que este contenha um fragmento heterólogo de tamanho adequado para compensar a região ausente do genoma fágico. Posteriormente, também foram desenvolvidas técnicas que permitem o empacotamento *in vitro* do DNA recombinante. Obtém-se dessa maneira um vírus infeccioso portador do DNA recombinante, o que aumenta significativamente a eficiência do processo, em relação à transformação utilizando plasmídeos.

Visando combinar vantagens dos dois sistemas de clonagem, o dos plasmídeos e o dos bacteriófagos, foi desenvolvida uma nova classe de vetores artificiais, os chamados cosmídeos. Tratam-se de plasmídeos nos quais foram inseridas pequenas seqüências do DNA do bacteriófago lambda (os sítios *cos*), necessárias para o empacotamento do DNA do fago na cabeça da partícula. Tais vetores conservam a característica de serem mantidos na bactéria sob a forma de plasmídeos, mas, por outro lado, podem ser empacotados *in vitro*, originando partículas de fago, capazes de infectar a bactéria, o que, como já vimos, constitui um processo altamente eficiente. Os cosmídeos continuam

sujeitos à limitação de tamanho imposta pela cabeça da partícula, mas permitem que seja empacotada uma quantidade muito maior de DNA estrangeiro (até 45 kb), uma vez que tiveram removida praticamente a totalidade do genoma fágico. Em relação aos plasmídeos, os cosmídeos apresentam a vantagem de que o DNA pode ser acondicionado em partículas de fago, que são muito mais estáveis, permitindo que o DNA seja conservado por períodos de tempo mais longos. Existem ainda vários outros vetores, derivados do lambda e de diferentes bacteriófagos, porém a sua descrição foge ao escopo deste capítulo. São dignos de nota os vetores derivados de fagos de DNA de fita simples, como é o caso do fago M13 de *E. coli*, porque facilitam grandemente certas etapas de manipulação genética. Assim, por exemplo, o seqüenciamento de DNA, a mutagênese *in vitro* e certos métodos de preparação de sondas requerem DNA de fita simples, como veremos adiante.

No caso de organismos eucarióticos, conhecem-se alguns poucos plasmídeos naturais⁽⁶⁾, como, por exemplo, o plasmídeo de 2µm da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, do qual se obteve a origem de replicação para a construção da maioria dos vetores da levedura. Para outros organismos, empregam-se vírus como vetores de clonagem, como é o caso de vírus de mamíferos e de insetos.

Também foram construídos vetores-ponte ou bifuncionais, que contêm origens de replicação e marcadores de seleção compatíveis com dois sistemas hospedeiros diferentes. Na verdade, a maioria dos vetores construídos para diferentes células eucarióticas consiste de vetores bifuncionais, capazes de transformar tanto a célula eucariótica em questão quanto a bactéria *E. coli*. Essa estratégia é interessante, porque permite que sejam aproveitadas as vantagens dos dois sistemas hospedeiros. Assim, por exemplo, embora a levedura também seja um microrganismo, ainda é muito mais cômodo realizar alguns dos passos da manipulação em *E. coli* como, por exemplo, a amplificação e extração do DNA plasmidial, o que se pode realizar com grande facilidade quando se utiliza um vetor bifuncional.

Quando se trabalha com genomas de eucariotos superiores, é necessário clonar fragmentos grandes de DNA. Para acomodar tais fragmentos, foi desenvolvido um tipo especial de plasmídeo de levedura, chamado YAC (Yeast Artificial Chromosome), que é capaz de aceitar inserções de ~300 kb, ou seja, 10 vezes mais DNA do que aceitam os plasmídeos bacterianos. O YAC contém todos os elementos de um verdadeiro cromossomo (origem de replicação, centrômero, 2 telômeros, além dos genes marcadores) e é portanto mitoticamente estável após a inserção de fragmentos grandes.

Em resumo, são as seguintes as características que deve ter o plasmídeo, para ser utilizado como vetor de clonagem:

a) Ter baixo peso molecular.

Permite que o vetor seja facilmente isolado intacto.

b) Apresentar pelo menos um sítio único para uma determinada enzima de restrição (sítio de clonagem).

Permite que o vetor seja clivado num só ponto, onde será inserido o DNA estrangeiro. Evidentemente, a presença de vários sítios únicos para diferentes enzimas de restrição é altamente desejável.

c) Ser portador de uma origem de replicação compatível com o sistema hospedeiro.

Permite que o vetor se perpetue entre a descendência da célula inicialmente transformada, originando um clone molecular.

d) Conter pelo menos um gene marcador.

Permite a seleção dos clones transformantes dentre um grande número de células submetidas ao processo de transformação.

e) Ter controle relaxado de replicação.

Permite que o DNA do plasmídeo seja amplificado, possibilitando a obtenção de quantidades ainda mais significativas do gene estrangeiro.

f) Não ser um plasmídeo conjugativo.

Trata-se de uma medida de segurança, visando evitar a disseminação do DNA recombinante fora do laboratório.

4.4 – Construção da molécula de DNA recombinante: diferentes estratégias

Há casos em que não é possível empregar enzimas de restrição para a clonagem. O principal problema advém do fato de que pode haver sítios suscetíveis à ação da enzima dentro da sequência gênica que se quer clonar, sendo portanto grande a probabilidade de se incorrer na inativação do gene. Para contornar esse problema, procede-se à fragmentação mecânica do DNA, que gera quebras ao acaso, garantindo que pelo menos algumas das moléculas não sejam quebradas dentro do gene de interesse. Essa coleção de fragmentos aleatórios é mais representativa do genoma e essa abordagem foi portanto bastante utilizada para a construção de bibliotecas genômicas dos mais diversos organismos. Entretanto, não é evidentemente possível obter extremidades coesivas através desse procedimento. Além disso, o emprego, seja de genes sintéticos, seja de cDNA (ver adiante), tampouco fornece extremidades coesivas.

Nesses casos, uma alternativa consiste no emprego da enzima transferase terminal. Diferentemente das demais DNA-polimerases, a transferase ter-

Enzima, encontrada em timo de vitela, tem a capacidade de adicionar nucleotídeos às extremidades 3'OH das cadeias de DNA, sem necessitar de uma fita de DNA-molde. Essa enzima foi portanto muito utilizada em Engenharia Genética⁽¹⁾. Por esse procedimento, chamado de método das extensões homopoliméricas, podem ser adicionados cerca de 100 resíduos de um determinado nucleotídeo (por exemplo, dATP) às extremidades do vetor e, por outro lado, cerca de 100 resíduos do nucleotídeo complementar (no caso, dTTP) às extremidades do DNA a ser inserido neste vetor, de tal forma que, quando estas diferentes moléculas forem colocadas em presença, possam emparelhar-se através de suas extremidades complementares (Fig. 4.5)

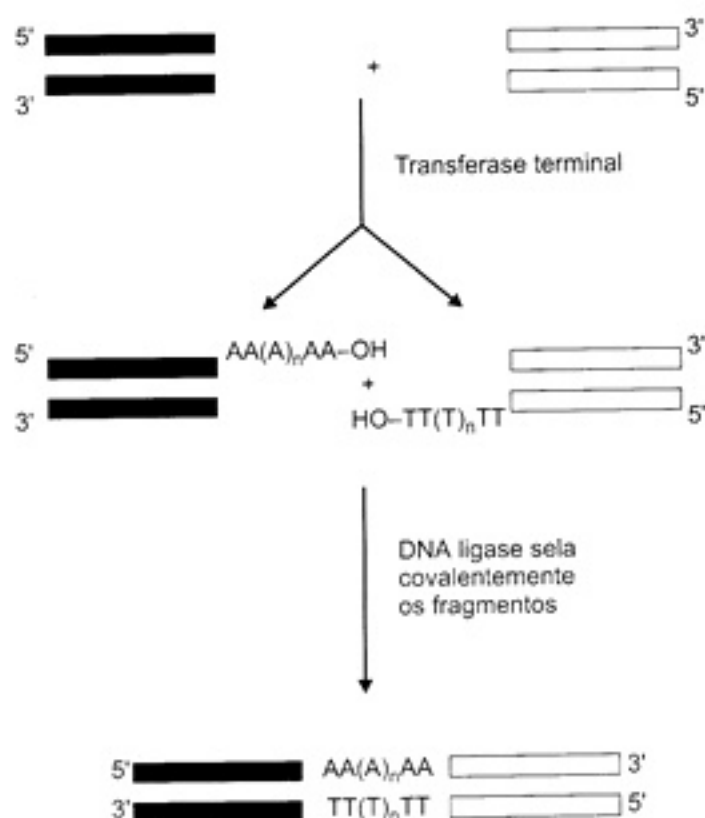


Figura 4.5 – Método das extensões homopoliméricas. Por ação da enzima transferase terminal, são adicionadas, *in vitro*, extensões poli-dA ao fragmento e poli-dT ao vetor. Essas extremidades complementares irão então associar-se e, por adição de DNA ligase ao sistema, formar-se-á uma ligação fosfodiéster entre o vetor e o fragmento. Em vez de extensões poli-dA/poli-dT, podem também ser criadas extensões poli-dC/poli-dG, se os precursores utilizados forem dCTP e dGTP.

Uma vantagem desse método é que não há possibilidade de o vetor voltar à forma original; só irão recircularizar-se os plasmídeos contendo a inserção e, conseqüentemente, todas as células transformadas conterão o DNA recombinante. Também é preciso considerar que, quando se trabalha com extremidades coesivas geradas por uma enzima de restrição, além de outras reações parasitas, diferentes fragmentos do DNA a ser clonado podem ligar-se entre si, de modo que teremos representada, no plasmídeo recombinante, uma situação diferente daquela do genoma original: seqüências que não eram contíguas no genoma original poderão ficar contíguas no plasmídeo. A aplicação do método das extensões homopoliméricas evita esse tipo de artefato. Entretanto, a desvantagem é que esse procedimento introduz longas regiões de pares poli(dA)-poli(dT) nas junções entre as duas espécies de DNA, o que pode afetar a função gênica. Outra desvantagem é que haverá dificuldades em se remover do vetor o fragmento de interesse, em etapas subseqüentes da clonagem. Hoje dispõem-se de outros métodos, que consistem em se recorrer a "ligadores", sintetizados quimicamente, constituídos de oligonucleotídeos contendo a seqüência de reconhecimento de uma determinada enzima de restrição. Tais ligadores são adicionados, por ação da enzima DNA ligase de T4 às extremidades do DNA que se quer clonar e, tratando-se em seguida este DNA com a enzima de restrição em questão, serão originadas as extremidades correspondentes. Uma das vantagens dessa estratégia é que o DNA inserido pode depois ser removido do vetor, através do tratamento com aquela determinada enzima de restrição. Hoje encontram-se disponíveis no mercado ligadores sintéticos desse tipo, para qualquer enzima de restrição, de modo que é possível inserir qualquer fragmento estrangeiro em qualquer sítio do vetor. A técnica da PCR (ver abaixo) também permite que se criem as extremidades desejadas no fragmento de DNA a ser amplificado.

Quando se realiza uma reação de ligação entre moléculas de DNA digeridas por uma mesma enzima de restrição, a inserção do fragmento heterólogo pode ocorrer em qualquer uma das duas orientações em relação ao vetor. Em certos casos, isso não tem importância, mas, em outros, necessita-se da entrada do fragmento apenas numa determinada orientação. Para obter a inserção na orientação correta, pode-se lançar mão do uso de duas diferentes enzimas de restrição, que produzam diferentes extremidades coesivas (extremidades A e B). Como somente duas extremidades A ou duas extremidades B vão poder se ligar, a entrada do fragmento no vetor também aberto por essas mesmas duas enzimas de restrição, vai ocorrer somente numa das orientações. Essa abordagem também apresenta a vantagem de que o vetor não poderá se recircularizar sem inserção.

O material genético a ser clonado pode ser obtido, seja diretamente a partir do genoma de outro organismo, seja por meio de síntese *in vitro*. Além disso, quando se conhece a seqüência de aminoácidos da proteína (casos pouco freqüentes), é possível deduzir a seqüência de DNA que a codifica e obter o

gene através de síntese química. Essa última abordagem só é viável no caso de polipeptídeos e foi empregada para a clonagem do gene da somatostatina, um pequeno hormônio de apenas 14 aminoácidos, tendo constituído um dos primeiros sucessos da Engenharia Genética⁽⁷⁾.

Entretanto, um dos caminhos mais diretos para o isolamento de um determinado gene consiste na clonagem do que se chama de *DNA complementar* (cDNA). Sabe-se que os genes de eucariotos são, na sua grande maioria, "genes partidos", isto é, apresentam a sequência codificante interrompida pela presença de introns. Os introns são sequências não codificadoras, que não irão resultar em sequências da proteína que o gene codifica. Em contrapartida, o RNA mensageiro maduro é o molde que será utilizado para a síntese da proteína. Assim, quando é possível isolar o mRNA de uma dada proteína, a clonagem fica grandemente facilitada. A partir desse mRNA pode-se obter o cDNA *in vitro*, por ação da enzima transcriptase reversa: essa enzima é capaz de sintetizar um DNA de dupla fita a partir de qualquer molécula de RNA, ficando o procedimento muito simplificado, quando o RNA for portador de uma sequência poli-A no seu terminal 3', como é o caso dos mRNAs eucarióticos. A Fig. 4.6 mostra os passos necessários para a obtenção do cDNA.

Quando não se pode dispor do gene isolado, a estratégia consiste na construção de uma coleção de plasmídeos (ou fagos), contendo *todos* os genes de um determinado organismo. Para obter uma tal *biblioteca genômica*, ou *banco genômico*, ou *genoteca*, deve-se proceder à fragmentação do DNA total extraído do organismo, de modo a originar uma coleção de fragmentos aleatórios. Isso pode ser conseguido por meio da fragmentação mecânica do DNA, ou por meio de uma digestão apenas parcial por uma ou mais enzimas de restrição. Em geral, utiliza-se uma enzima de restrição que reconhece uma sequência curta, como a enzima *Sau3A*, que reconhece uma sequência de 4 nucleotídeos, sob condições em que não consiga digerir o DNA por completo. Nessas condições de digestão parcial, nem todas as moléculas de DNA serão cortadas em todos os sítios suscetíveis à enzima e alcança-se portanto uma distribuição quase randômica de fragmentos. Com essa coleção de fragmentos, pode-se então criar uma coleção de plasmídeos híbridos, representativa do genoma inteiro do organismo. O número de clones necessários para cobrir todo o genoma será diferente, conforme o tamanho do genoma do organismo. Assim, por exemplo, utilizando *lambda* como vetor, serão necessários 1.500 clones recombinantes para construir uma genoteca de *E. coli*, 4.600 clones para *S. cerevisiae* e 800.000 clones para mamíferos. Evidentemente, o número de clones necessários vai também depender do tamanho médio dos fragmentos: quanto maior o tamanho do fragmento, menos clones serão necessários. Conseqüentemente, para a construção de bancos genéticos, preferem-se vetores que aceitem fragmentos grandes, tais como cosmídeos ou YACs. Uma outra abordagem consiste em se construir uma *biblioteca de cDNA*, a partir do mRNA total de uma determinada célula. A biblioteca de cDNA, entretanto, representa apenas os genes que estão se expressando naquele determinado momento da vida da célula. Tendo em mãos uma biblioteca genética, pode-se empreender a busca do gene desejado, como veremos no item 4.7.

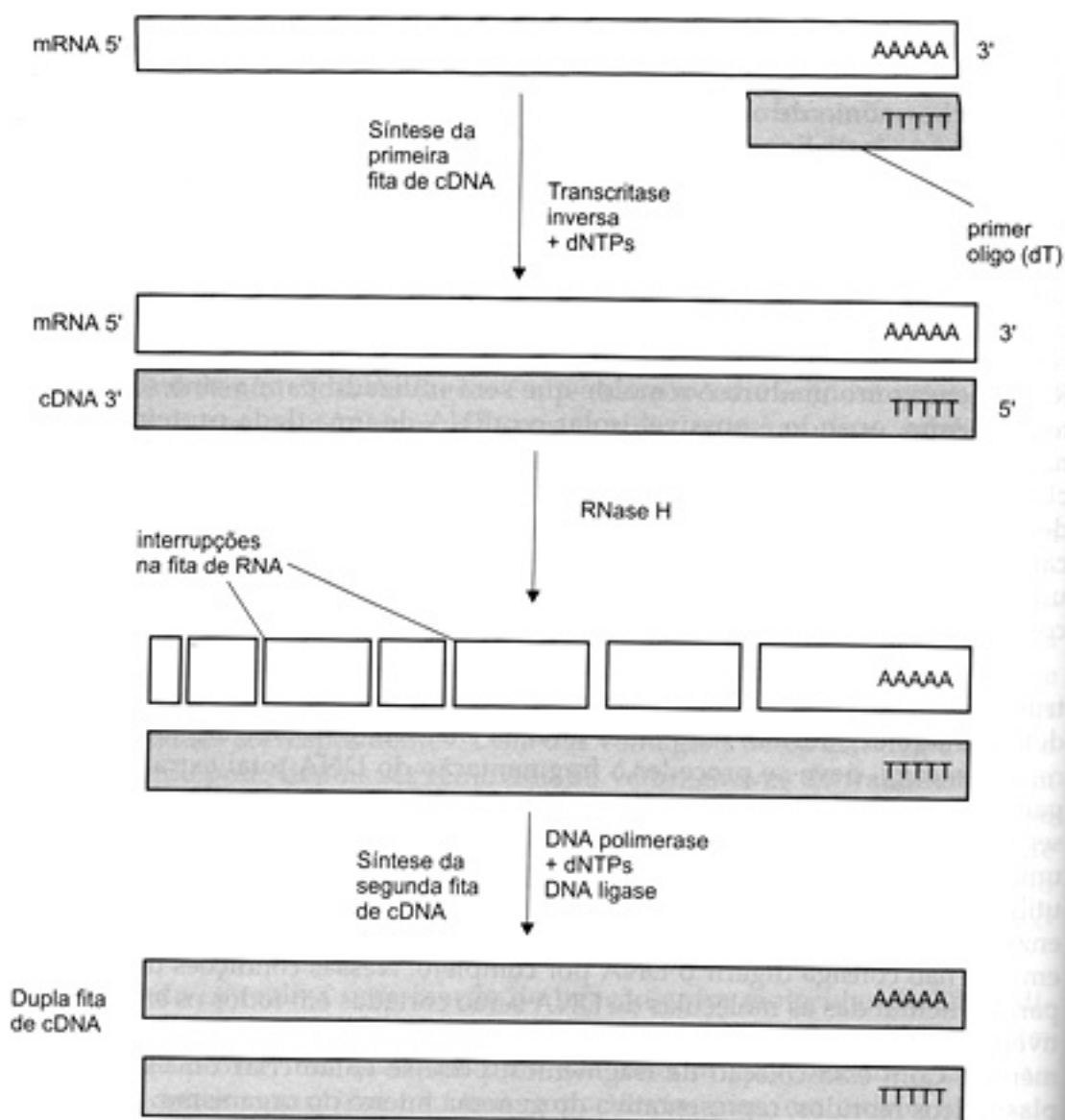


Figura 4.6 – Obtenção do cDNA. Um dos métodos para se obter cDNA a partir do mRNA eucariótico, que contém normalmente uma extensão poli(A) na sua extremidade 3', consiste em incubar o mRNA com oligonucleotídeos [oligo(dT)], que irão hibridar-se ao poli(A), servindo como primers para a enzima transcriptase reversa sintetizar a 1.ª fita do cDNA. Para remover a fita de mRNA da molécula híbrida, há várias alternativas. Uma delas consiste em utilizar a enzima RNase H de *E. coli*, que irá introduzir interrupções na fita de RNA que compõe a molécula híbrida. Tais interrupções serão utilizadas como sítios de iniciação para a enzima DNA-polimerase I de *E. coli*, que irá sintetizar a 2.ª fita do cDNA, tomando por molde a 1.ª fita. O último passo consiste na adição de DNA ligase, que irá selar qualquer interrupção remanescente.

Recentemente, foi descoberta uma nova técnica de síntese de DNA *in vitro*, que permite amplificar diretamente uma determinada região do genoma. Trata-se da técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction)⁽⁸⁾, que teve um impacto formidável em Biologia Molecular. Para aplicar a PCR, é entretanto necessário

que se conheçam as seqüências (~20bp são suficientes), que ladeiam a seqüência de DNA de interesse, para poder primeiramente proceder à síntese química destes oligonucleotídeos, que irão então servir como iniciadores do processo de polimerização (primers). O primer é necessário porque a DNA-polimerase requer uma pequena região de DNA de dupla fita para iniciar a síntese da fita-filha: a grande vantagem é que, quando se utilizam dois primers, só será sintetizada pela DNA-polimerase a região de DNA compreendida entre eles. Em outras palavras, os primers irão limitar a síntese a uma região específica do DNA, o que levará à amplificação apenas desta seqüência (Fig. 4.7). O procedimento é bastante simples: uma preparação de DNA, que pode consistir do genoma inteiro do organismo, é primeiramente desnaturada por tratamento térmico, em presença dos dois primers complementares às seqüências que ladeiam a seqüência de interesse, em ambas as fitas desnaturadas. Com a presença dos quatro dNTPs precursores e da DNA-polimerase bacteriana no sistema, ocorrerá a síntese da fita simples complementar ao DNA-molde, a partir da extremidade 3'OH de cada primer. Assim, cada ciclo da PCR envolve o seguinte:

- 1) Desnaturação térmica da dupla fita do DNA-alvo.
- 2) Resfriamento, para permitir o emparelhamento dos primers com as regiões complementares nas duas fitas desnaturadas do DNA.
- 3) Extensão dos primers, por ação da DNA-polimerase.

A grande vantagem da PCR consiste na possibilidade de se repetir o ciclo inteiro por várias vezes, bastando para isto desnaturar as novas moléculas de DNA dupla fita que vão se formando, em condições de excesso de primers. O resultado é um crescimento exponencial da região de interesse, definida pelos dois primers: assim, repetindo-se o ciclo por 25 vezes, obtém-se uma amplificação de até 4×10^6 da região de interesse. Com a descoberta de DNA-polimerases termorresistentes, a PCR pôde ser automatizada e, hoje em dia, é possível amplificar seqüências de DNA de até 30 kb, em máquinas pouco onerosas.

A técnica da PCR veio revolucionar toda a área da Engenharia Genética, porque permite que se produzam ilimitadas cópias de um segmento específico do DNA, sem ter que recorrer à clonagem. Como mencionado acima, uma vez que são os dois primers que definem o segmento que se quer amplificar, não é necessário isolar este segmento para poder aplicar a PCR. Além disso, a quantidade de DNA necessária para começar o processo é muito pequena, sendo suficientes quantidades da ordem de 1µg de DNA genômico. Tampouco é necessário um alto grau de pureza do DNA, podendo ser empregado diretamente DNA obtido a partir da lise celular. A técnica da PCR é extremamente versátil e vem, conseqüentemente, encontrando inúmeras aplicações, dentre as quais se destacam o diagnóstico de diversas doenças infecciosas, bem como

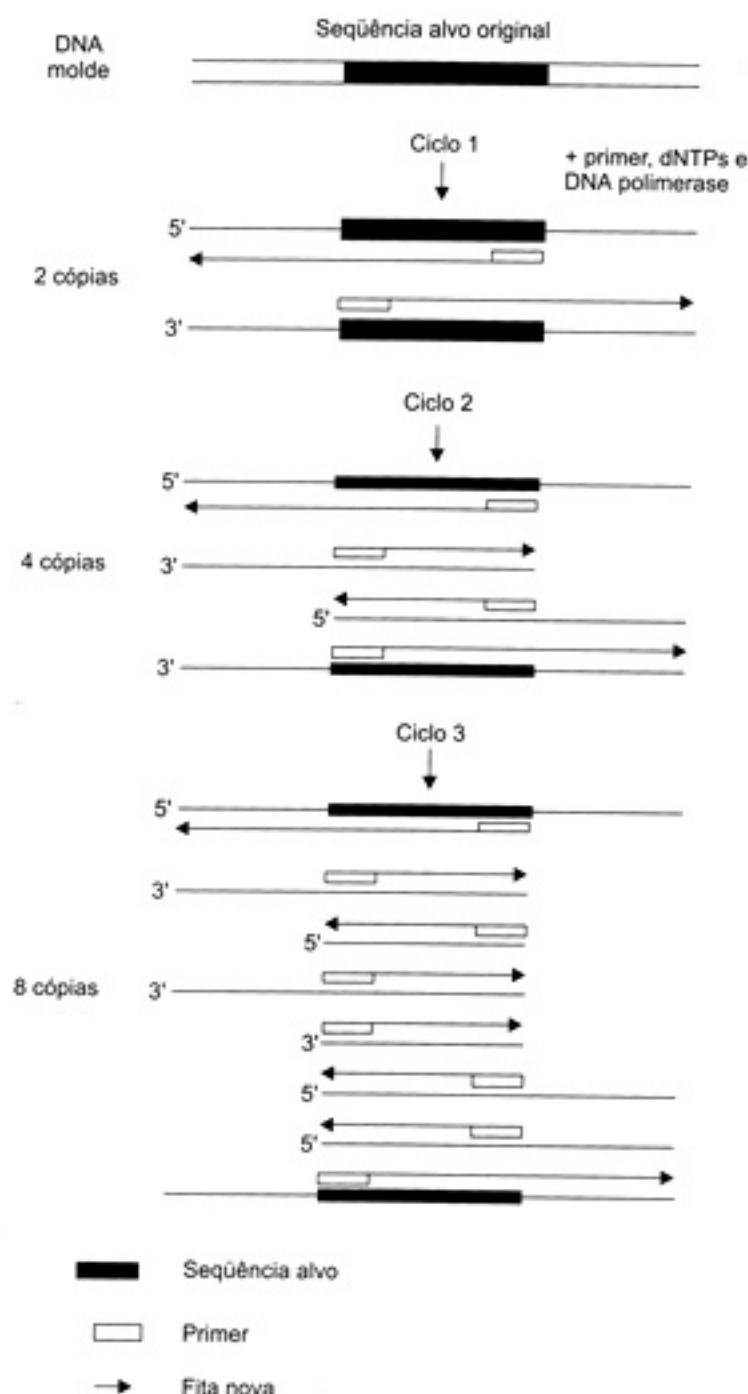


Figura 4.7 – A reação em cadeia da polimerase (PCR). O DNA contendo a seqüência a ser amplificada (barra sólida) é primeiramente desnaturado por elevação da temperatura. Após a separação das 2 fitas do DNA-mãe, a DNA-polimerase irá sintetizar 2 novas fitas, (nas direções indicadas pelas flechas), a partir de cada um dos primers (barra não sólida) e tomando como molde as fitas-mãe. O ciclo de aquecimento-resfriamento é repetido, até que se obtenha a amplificação desejada do fragmento de DNA. Deve-se notar que, embora ocorra a síntese de algumas moléculas mais longas do que a seqüência-alvo, estas irão diluir-se ao longo dos ciclos sucessivos e irão portanto predominar na população moléculas-filhas apenas da seqüência-alvo, ou seja, da seqüência contida entre os 2 primers.

de doenças genéticas. Além disso, a alta sensibilidade da PCR permitiu o desenvolvimento do "DNA fingerprinting" (impressão digital do DNA), uma técnica de alto poder de resolução, que possibilita a identificação de indivíduos (determinação de paternidade, determinação de suspeitos em casos policiais), a partir de amostras diminutas do seu DNA. A sensibilidade da PCR é tal que já permitiu a amplificação e clonagem de DNA obtido de múmias humanas e de plantas e animais já extintos. A única exigência da PCR é a disponibilidade dos primers adequados: é preciso saber quais são as seqüências vizinhas à região de interesse que se deseja amplificar. Entretanto, quando se dispõe de um fragmento de DNA qualquer, inserido num vetor conhecido, é óbvio que essa dificuldade desaparece, já que se podem utilizar como primers as seqüências contíguas do próprio vetor.

4.5 – Expressão da informação genética heteróloga

Com os desenvolvimentos da Engenharia Genética, é hoje possível expressar qualquer gene em qualquer organismo hospedeiro, desde bactérias, leveduras, fungos filamentosos e insetos, até plantas e mamíferos transgênicos. Vetores especializados tiveram entretanto de ser desenvolvidos, para não apenas transformar eficientemente, mas também fornecer as condições necessárias para a expressão do DNA clonado em cada um desses tipos celulares.

A síntese de uma proteína funcional a partir do gene clonado depende de vários passos metabólicos, que deverão ser realizados pela célula hospedeira:

- 1) Transcrição do gene, originando o mRNA.
- 2) Processamento ("splicing") do mRNA, que irá remover as regiões correspondentes aos introns.
- 3) Tradução do mRNA em proteína.
- 4) Processamento pós-traducional: há proteínas que, uma vez sintetizadas, necessitam ainda sofrer modificações, para poderem ter atividade biológica.
- 5) Além disso, uma vez pronta, é preciso que a proteína heteróloga não seja degradada pela célula hospedeira.

Evidentemente, uma falha em qualquer um desses passos resultará na ausência do produto do gene clonado.

Para garantir a expressão do gene clonado, foram desenvolvidos vetores especiais, chamados de *vetores de expressão*, que são portadores dos diversos elementos genéticos necessários às etapas de transcrição e de tradução que a célula hospedeira deverá realizar. É importante ressaltar que diferentes sistemas hospedeiros exigem elementos específicos. Vamos aqui nos limitar a descrever os requerimentos específicos da célula bacteriana. Na Fig. 4.8 está representado um modelo de vetor de expressão para *E. coli*.

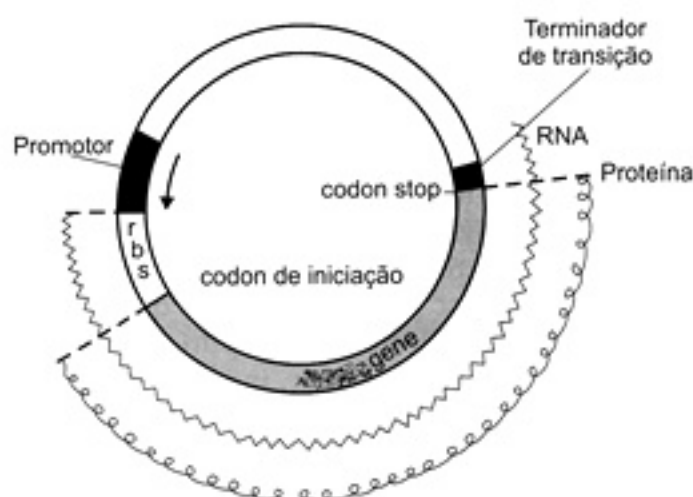


Figura 4.8 – Vetor de expressão de *E. coli*. O DNA do vetor contém os elementos genéticos necessários para a transcrição (promotor e terminador) e para a tradução (rbs, compreendendo a sequência S-D e o códon de iniciação) do gene estrangeiro. A seta indica a direção em que ocorrerá a transcrição do gene pela RNA-polimerase da bactéria que hospeda este plasmídeo recombinante.

Para que ocorra a *transcrição*, é necessário que o gene clonado esteja intercalado entre um promotor e um terminador de transcrição — sequências de DNA que são reconhecidas pela RNA-polimerase da célula hospedeira. Hoje, já foram isolados diferentes promotores bacterianos, que variam quanto à sua intensidade e seu modo de ação. Os promotores fortes são aqueles que sustentam uma alta taxa de transcrição, e foram isolados de genes cujos produtos são requeridos em altas concentrações para o funcionamento normal da célula. Por sua vez, os promotores fracos, que são relativamente ineficientes, foram isolados de genes cujos produtos são suficientes em pequenas quantidades para o funcionamento normal da célula. Dependendo da finalidade da clonagem, às vezes pode ser interessante utilizar um promotor fraco como, por exemplo, no caso de proteínas tóxicas para a célula hospedeira. Entretanto, a situação ideal é poder cultivar a bactéria portadora do gene clonado até a cultura atingir a máxima densidade de células, para só então provocar a expressão maciça do gene clonado. Para essa finalidade, são muito utilizados vetores contendo um *promotor regulável*, que permite um controle mais estrito da expressão. Em *E. coli*, a regulação da transcrição pode ocorrer, seja por indução, seja por repressão. Um gene induzível é aquele cuja transcrição só ocorre em presença do indutor: geralmente, o indutor consistirá do substrato da enzima codificada pelo gene em questão. Em contrapartida, um gene repressível é aquele cuja transcrição deixa de ocorrer em presença da substância repressora. Um dos promotores mais frequentemente utilizados para a expressão em *E. coli* é o promotor *lac*, que controla a transcrição do gene *lacZ*, codificador da enzima β -galactosidase. Esse promotor é induzido por lactose ou outros β -galactosídeos, como o isopropil-tiogalactosídeo (IPTG), de modo que, ao se adicionar IPTG ao meio de cultura, o promotor *lac* entrará em ação

e haverá transcrição do gene que tiver sido clonado sob o seu controle. Outro promotor bastante utilizado é o promotor *trp*, que é reprimido por triptofano, podendo também ser induzido por ácido 3-indolilacético. Um promotor extremamente forte é o promotor λP_L , um dos promotores responsáveis pela transcrição dos genes do bacteriófago lambda. Esse promotor é reconhecido pela RNA-polimerase de *E. coli*, quando o fago está desenvolvendo o ciclo lítico. Quando o fago está no ciclo lisogênico, esse promotor é reprimido pelo produto do gene λcI . Os vetores de expressão que contêm o promotor λP_L são utilizados com uma linhagem de *E. coli*, portadora de uma versão mutante do gene *cI* (no próprio vetor ou então num profago), que sintetiza uma forma termossensível da proteína repressora *cI*. Assim, em temperaturas até 30°C, essa proteína mutante mantém a capacidade de reprimir o promotor λP_L ; em temperaturas mais elevadas, a proteína é inativada e, conseqüentemente, ocorre a transcrição do gene clonado sob este promotor. Um outro sistema de expressão muito eficiente, que utiliza um promotor do fago T7 e a RNA-polimerase do próprio T7, foi desenvolvido mais recentemente. Quando o fago T7 infecta *E. coli*, a bactéria passa a produzir a RNA-polimerase de T7, que reconhece apenas os promotores de T7, de modo que a bactéria passará a transcrever preferencialmente os genes de T7. Tirando proveito desse fato, foram construídos vetores onde o gene clonado fica sob o controle do promotor de T7 e que contêm ao mesmo tempo o gene que codifica a RNA-polimerase do fago, sob o controle de um promotor regulável de *E. coli* como, por exemplo, o promotor *lac*. Quando se transforma a bactéria com esse vetor, a expressão do gene clonado ocorre logo após se induzir a transcrição da RNA-polimerase de T7. Como essa RNA-polimerase reconhece apenas o promotor do fago, ocorrerá transcrição apenas do gene clonado e não dos demais genes da hospedeira.

Por outro lado, como as bactérias não são capazes de realizar o processamento do RNA para se obter expressão de genes contendo introns (a grande maioria dos genes de organismos eucarióticos), será necessário primeiramente remover estes introns. O caminho mais direto é sem dúvida realizar a clonagem do cDNA.

Para que ocorra a *tradução*, é necessário que o mRNA contenha um sítio de ligação ao ribossomo (rbs), que inclui o códon de iniciação da tradução (AUG ou GUG) e uma sequência complementar ao terminal 3' do RNA ribossômico 16s (sequência Shine-Dalgarno, ou S-D). Conseqüentemente, vetores de expressão devem conter uma sequência rbs logo em seguida ao promotor. A sequência S-D pode variar em comprimento (3-9 bp) e precede o códon de iniciação em 3-12 bp. Essa distância deve ser respeitada para se obter boa eficiência da tradução. O processo da tradução termina quando for encontrado um códon stop (UAA, UAG ou UGA) no mRNA.

No que diz respeito ao processamento *pós-traducional*, as bactérias são incapazes de realizar a maioria das modificações características das proteínas eucarióticas. Tal é o caso, por exemplo, da insulina humana, que é sintetizada

na forma de um precursor, a pró-insulina, contendo, além das cadeias A e B, uma sequência adicional de 35 aminoácidos (a cadeia C), importante para que a molécula de insulina adquira a sua conformação tridimensional final, mas que deve ser removida antes que a insulina se torne biologicamente funcional. A bactéria não é capaz de remover a cadeia C da pró-insulina, de modo que, para obter a insulina humana a partir de bactéria, foi necessário clonar e expressar separadamente genes sinteticamente construídos das cadeias A e B, purificá-las e só então ligá-las num passo *in vitro*⁽⁹⁾. Assim, quando se deseja obter uma proteína eucariótica que precisa sofrer esse tipo de modificações, deve-se usar como hospedeira uma célula eucariótica como, por exemplo uma levedura.

Em certos casos, como por exemplo o da expressão da somatostatina e interferon humanos em *E. coli*, a proteína sofre degradação pelas proteases da célula hospedeira. Para contornar esse problema, pode-se realizar a clonagem de forma a resultar numa proteína de fusão com alguma proteína natural da hospedeira, o que protege a proteína estrangeira da ação das proteases. Assim, foi possível obter somatostatina produzida por *E. coli*, sob a forma de uma fusão com a β -galactosidase bacteriana. Para liberar a somatostatina biologicamente ativa, a proteína de fusão precisou ser clivada, o que se conseguiu num passo subsequente, realizado *in vitro*, consistindo de tratamento com brometo de cianogênio⁽⁷⁾. Entretanto, nem sempre é possível realizar satisfatoriamente esse último passo: como o brometo de cianogênio cliva a cadeia peptídica a cada resíduo de metionina, esta abordagem experimental só funciona para peptídeos que não contenham metioninas internas, como é o caso da somatostatina. Uma outra maneira de atenuar o problema da degradação protéica consiste em se utilizar como hospedeiras linhagens mutantes, que apresentam um complemento reduzido de proteases intracelulares. Também a localização celular da proteína heteróloga pode influir na sua estabilidade na célula hospedeira. Assim, no caso da pró-insulina de rato expressada em *E. coli*, foi verificado que a meia-vida da proteína heteróloga era de ~2 minutos no citoplasma, mas de ~20 minutos no periplasma da bactéria hospedeira⁽¹⁰⁾.

Quando se deseja obter a secreção da proteína codificada pelo gene clonado, é ainda necessário que ela seja sintetizada sob a forma de um precursor, tendo no seu terminal amino um peptídeo-sinal. O peptídeo-sinal consiste de uma curta sequência de amino-ácidos hidrofóbicos, que é responsável pela passagem da proteína através da membrana celular. O peptídeo-sinal é naturalmente removido por ação de uma peptidase, à medida em que a proteína vai sendo secretada. Pode-se portanto anexar ao vetor de expressão a sequência de DNA que codifica o peptídeo-sinal de alguma proteína normalmente secretada pela célula hospedeira, de tal modo que a clonagem resulte numa fusão gênica, na qual deve ser observada a fase de leitura correta, para originar o precursor protéico contendo o peptídeo-sinal.

4.6 – Isolamento do gene clonado

Em última análise, o sucesso de um experimento de clonagem depende da possibilidade de se distinguir e isolar o clone que contém o gene de interesse. Entretanto, essa tarefa é muitas vezes comparável a se achar uma agulha no palheiro. Considerando que o tamanho do genoma de uma célula de mamífero é de aproximadamente 10^9 bp, um gene (~5.000 bp) representa apenas 0,0005% do DNA total. Mesmo um organismo tão simples quanto o *E. coli* contém milhares de genes, de modo que uma digestão por enzima de restrição do DNA total irá produzir não apenas o fragmento portador do gene que nos interessa, mas uma população de fragmentos contendo outros genes. Durante a etapa da DNA ligase, todos esses diferentes fragmentos estarão sujeitos a se inserir separadamente numa das moléculas do vetor, e, conseqüentemente, serão produzidas diferentes moléculas de DNA recombinante, cada uma contendo um pedaço diferente do genoma do organismo. Após a transformação da célula hospedeira com essa coleção de plasmídeos híbridos, será obtida também uma coleção de clones recombinantes. Quando essa coleção for representativa do genoma inteiro do organismo, teremos em mãos uma biblioteca genômica, como descrito acima. É portanto necessário poder identificar no meio dessa coleção aquele clone específico que nos interessa. Diferentes estratégias podem ser utilizadas para essa finalidade.

4.6.1 – Métodos genéticos

Consistem em se conseguir a complementação de alguma função deficiente na célula hospedeira. Foi assim, por exemplo, que pôde ser isolado o gene *LEU2* da levedura *S. cerevisiae*, que codifica a enzima isopropilmalato-desidrogenase⁽¹¹⁾. Transformando-se uma linhagem mutante de *E. coli*, incapaz de produzir essa enzima, com uma biblioteca genômica da levedura, foi isolado o plasmídeo do clone bacteriano que mostrou ter recuperado a capacidade de produzir a enzima: este plasmídeo era portador do gene *LEU2* da levedura. Embora seja extremamente direto e eficiente, esse método exige que ocorra a expressão do gene clonado e, além disto, que a proteína heteróloga desempenhe uma função detectável na célula hospedeira. Um exemplo peculiar de detecção direta do gene estrangeiro foi o da clonagem do gene da luciferase de vagalume em *E. coli*: as colônias recombinantes puderam ser identificadas porque se tornaram luminescentes no escuro!

4.6.2 – Métodos imunoquímicos

Quando a proteína estrangeira não tem uma função aparente na célula hospedeira, é necessário empregar um método de detecção imunoquímico. A aplicação de um método imunoquímico vai depender de se dispor do anticorpo contra a proteína codificada pelo gene em questão e pressupõe, portanto, que este gene esteja sendo expressado pela célula hospedeira. Assim, quando se pretende utilizar essa metodologia, costuma-se partir de uma biblioteca de

cDNA construída em vetor de expressão. Embora existam várias versões de rastreamento imunológico, a mais popular é aquela que se realiza diretamente com as colônias recombinantes, como esquematizado na Fig. 4.9a. As colônias (ou placas de lise, no caso de se ter utilizado um fago como vetor) são primeiramente transferidas por "carimbagem" da placa-mãe sobre um filtro de nitrocelulose. Esse procedimento transfere uma amostra de cada colônia, mantendo a mesma localização das colônias na placa e no filtro. O filtro é então tratado para lisar as células e expor as proteínas de cada colônia, e, a seguir, incubado com uma solução contendo o anticorpo contra a proteína desejada. Após remover-se o anticorpo não ligado, utiliza-se um 2.º anticorpo ou a proteína A de *Staphylococcus aureus*, para localizar a posição do 1.º anticorpo. A proteína A liga-se especificamente à imunoglobulina e, utilizando-se proteína A marcada com ^{125}I , a detecção da colônia que está exprimindo a proteína desejada se fará por auto-radiografia. Na auto-radiografia, expõe-se um filme sensível a raios X ao filtro, para então revelar-se o filme: se houver radiatividade em alguma colônia, aparecerá uma mancha preta no filme, na posição correspondente à colônia. Tendo sido identificada a colônia, volta-se à placa-mãe de origem para recuperar as células vivas, que estarão na posição correspondente.

4.6.3 – Métodos de hibridação de ácidos nucleicos

Esses métodos irão identificar o próprio DNA clonado, não necessitando portanto que a célula esteja exprimindo o produto gênico correspondente. Tais métodos baseiam-se na propriedade que moléculas de ácidos nucleicos em fita simples (DNA ou RNA) apresentam, de se associarem através de pontes de hidrogênio, formando moléculas de dupla fita híbridas, desde que haja um grau suficiente de complementaridade entre a sequência de bases das duas fitas simples. Esse tipo de molécula híbrida pode ser formado entre duas fitas de DNA, duas fitas de RNA, ou entre uma fita de RNA e uma fita de DNA.

Essa propriedade pode ser utilizada para a identificação de um determinado clone recombinante, bastando para isto que se disponha de uma *sonda genética*, consistindo do DNA ou RNA complementar ao gene desejado. Pode-se empregar esse método de detecção, diretamente (*in situ*), em colônias bacterianas ou em placas de lise de bacteriófagos, como ilustrado na Fig. 4.9b. Através de um procedimento análogo ao descrito acima, após o crescimento das colônias, estas são "carimbadas" sobre um filtro de nitrocelulose ou membrana de náilon. Esse filtro é inicialmente tratado para expor, desnaturar e fixar o DNA de cada colônia e então incubado em presença da sonda genética marcada. Para se obter a sonda marcada, o método clássico consiste na incorporação de um nucleotídeo radiativo (^{32}P), de modo que a detecção da hibridação, no passo final, é feita através de auto-radiografia. Hoje em dia, está-se dando preferência a outros métodos de marcação, que não envolvem radiatividade, para evitar riscos desnecessários ao pesquisador e ao meio ambiente.

Foram portanto desenvolvidos métodos alternativos de marcação, dentre os quais se destacam aqueles que se baseiam na reação entre biotina e avidina, esta última acoplada a um marcador de fluorescência. Uma vez identificado o clone que contém o DNA desejado, volta-se à placa original da qual foi obtido o filtro carimbado, para se recuperar as células vivas.

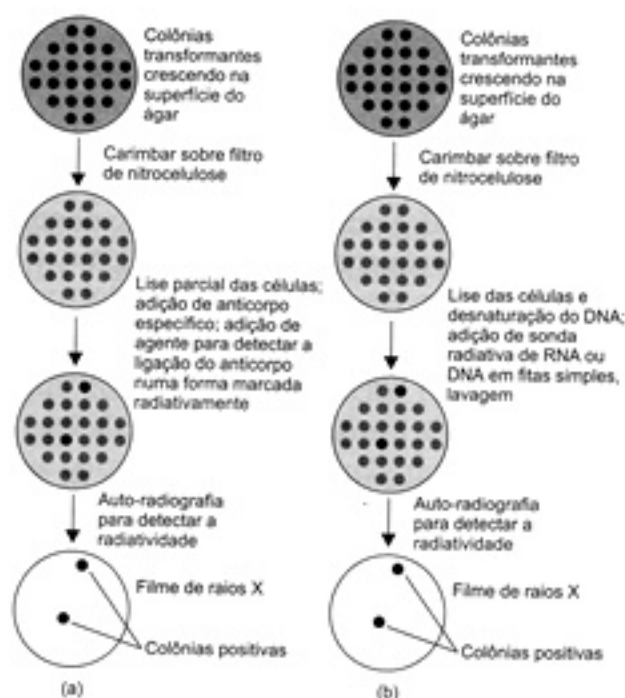


Figura 4.9 – Identificação in situ da colônia recombinante. a) Identificação por meio de anticorpo específico: o clone recombinante é identificado por estar produzindo a proteína codificada pelo gene clonado. b) Identificação por meio de sonda genética: o clone recombinante é identificado por conter o DNA complementar à sonda.

É possível ter uma sonda genética disponível nos seguintes casos:

a) Quando se isolou o RNA correspondente ao gene em questão, tRNA, rRNA, ou mRNA. Assim, por exemplo, o 1.º gene eucariótico a ser isolado foi o gene da globina de coelho, a partir do isolamento do seu mRNA⁽¹²⁾. O isolamento do mRNA da globina a partir de eritrócitos é extremamente facilitado, uma vez que os eritrócitos são células especializadas, que só produzem globina. Essa não é entretanto a situação que se verifica para a grande maioria das proteínas. Como alternativa, pode-se obter o mRNA através da sua capacida-

de de dirigir a síntese do produto do gene desejado num sistema de tradução *in vitro*, mas esta abordagem já é mais sofisticada. Hoje em dia, graças aos desenvolvimentos na área de síntese e seqüenciamento de oligonucleotídeos, cultura e transformação genética de células de mamíferos, além da PCR, tornou-se bem mais simples a tarefa de obter cDNAs completos, assim como a de clonar cDNAs a partir de mRNAs pouco abundantes na célula de origem. Uma vez tendo em mãos o mRNA, este pode evidentemente ser utilizado como sonda para identificar o clone genômico.

b) Quando se trata de um gene com alto grau de conservação, é possível empregar uma sonda heteróloga, ou seja, o DNA de outro organismo. Assim, por exemplo, o gene da actina de *S. cerevisiae* foi isolado empregando-se como sonda um cDNA de actina de *Dictyostelium discoideum*⁽¹³⁾.

c) Quando já se tiver algumas informações sobre a seqüência da proteína codificada pelo gene de interesse, é possível sintetizar o oligonucleotídeo correspondente, representando uma pequena seqüência do gene, e este oligonucleotídeo será empregado como sonda. Assim, no caso do citocromo *c* da levedura, já se dispunha de dados de análise da seqüência da proteína, donde foi deduzida uma seqüência de DNA de 44bp, que pôde então ser utilizada como sonda para o isolamento do gene CYC1⁽¹⁴⁾.

Quando se dispõe de uma sonda genética, além da hibridação de colônias descrita acima, pode-se realizar a hibridação do tipo *Southern*. Nesse método hibrida-se a sonda com o DNA extraído das células recombinantes, previamente identificadas pela hibridação de colônias. Esse DNA é primeiramente digerido por uma ou mais enzimas de restrição, separam-se os fragmentos resultantes por eletroforese em suporte de gel e desnaturam-se os fragmentos *in situ*, antes de transferí-los para um filtro de nitrocelulose, que será incubado com a sonda marcada. Por meio da auto-radiografia do filtro, pode-se portanto identificar o fragmento de DNA que corresponde àquela determinada sonda. A mesma técnica, com ligeiras modificações, pode ser realizada utilizando RNA fixado sobre o filtro e, neste caso, o procedimento é denominado de hibridação do tipo *Northern*. Por meio do *Northern*, pode-se verificar se um determinado gene é transcrito apenas numa determinada situação ou tipo celular. Para tanto, extrai-se o RNA total da célula, em diferentes momentos do seu ciclo de vida, ou em diferentes condições de cultivo, ou de diferentes tipos celulares, para a realização do *Northern*. Se ocorrer hibridação com o DNA do gene clonado, saberemos que estava havendo transcrição do gene naquelas células. Também as proteínas das células transformantes podem ser separadas por eletroforese, para serem em seguida identificadas, através de reação com o anticorpo específico e, neste caso, a análise é denominada de *Western*.

Uma vez isolado, o gene pode ter a sua sequência de nucleotídeos determinada, ser submetido a alterações dirigidas, que permitirão compreender as relações entre estrutura e função, bem como ser transferido para diferentes vetores, que irão transformar outras células hospedeiras.

No que se refere ao *seqüenciamento de DNA*, destacam-se as contribuições de Fred Sanger, que desenvolveu diversas metodologias, das quais a mais utilizada é aquela que utiliza, como precursores para a síntese de DNA, 2',3'-didesoxinucleotídeos (ddNTPs), que interrompem a elongação da cadeia de DNA pela DNA-polimerase⁽¹⁵⁾. O didesoxinucleotídeo pode ser eficientemente incorporado na cadeia nascente, todavia, irá bloquear a progressão da síntese da cadeia, porque não tem o grupo hidroxila na posição 3' do açúcar. Como esse grupo hidroxila é necessário para que o nucleotídeo seguinte seja acrescentado à cadeia, toda a vez que um ddNTP for incorporado, ocorrerá a terminação da cadeia neste ponto. O princípio do método é simples: quando se colocam, num tubo de ensaio, além do fragmento de DNA a ser seqüenciado (em fita simples), a DNA-polimerase, um primer marcado radioativamente, todos os quatro desoxiribonucleotídeos normais (dNTPs), e mais apenas um deles na forma didesoxi, por exemplo, a timidina (ddTTP), toda a vez em que houver incorporação de uma ddTTP na fita que a DNA-polimerase está sintetizando, ocorrerá a parada da síntese neste ponto. Isso demonstra que, precisamente naquele ponto da fita-molde, existe uma adenosina. Na verdade, utilizam-se quatro tubos em paralelo, cada um contendo apenas um dos NTPs na forma didesoxi. No passo seguinte, os fragmentos sintetizados em cada um dos quatro tubos são separados de acordo com o seu tamanho, por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante. Para a leitura da sequência, expõe-se um filme de raios X ao gel. Na Fig. 4.10, está esquematizado o procedimento. É importante ressaltar que a proporção ddNTP:dNTP deve ser cuidadosamente estabelecida, para permitir que a sequência de DNA seja determinada corretamente. De fato, se houver excesso do ddNTP, só será possível ler o início da sequência.

Hoje dispõem-se de máquinas automatizadas, que permitem o seqüenciamento de genomas inteiros, como é o caso do seqüenciamento total de todos os cromossomos da levedura *S. cerevisiae*, que acaba de ser completado em abril de 1996 por uma rede de laboratórios associados. A levedura é portanto o primeiro organismo eucariótico a ter a sua sequência genética inteiramente determinada, mas está em curso também o Projeto Genoma Humano, que se propõe a seqüenciar todos os cromossomos humanos. Tendo-se em mãos a sequência do gene, pode-se deduzir a sequência da proteína que ele codifica. Na verdade, é mais fácil obter a sequência da proteína por esse caminho do que pelo seqüenciamento da própria proteína, que pode levar meses ou até anos.

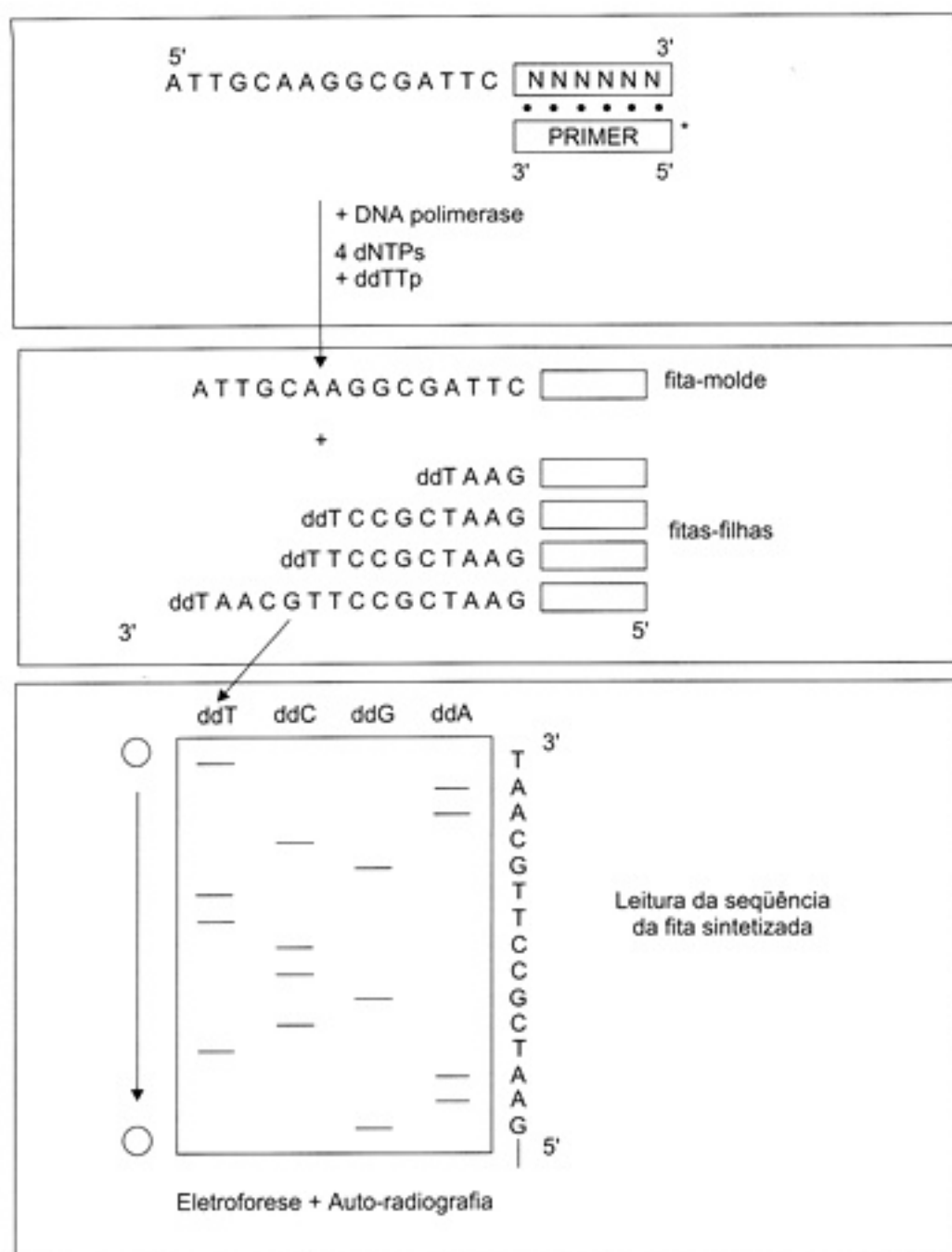


Figura 4.10 – Sequenciamento de DNA pelo método enzimático de Sanger. O fragmento de DNA que se quer sequenciar foi inicialmente clonado num plasmídeo de fita simples. Para iniciar a síntese *in vitro* da nova fita pela DNA-polimerase, é adicionado um primer, marcado na sua extremidade 5', consistindo de uma curta sequência complementar ao DNA do plasmídeo. Em cada um dos 4 tubos, adicionam-se ainda os 4 dNTPs normais e apenas um ddNTP (ddATP, ddTTP, ddCTP ou ddGTP). Esse ddNTP, ao ser incorporado na fita de DNA nascente, acarretará a terminação da 2.ª fita neste ponto. No passo seguinte, estas 4 preparações são submetidas à eletroforese em gel desnatante, para separar os fragmentos pelo seu tamanho. A autoradiografia do gel mostrará os fragmentos recém-sintetizados. Da sequência lida no autoradiograma, deduz-se a sequência (complementar) do DNA original.

O DNA isolado e sequenciado pode também ser mutagenizado *in vitro*, de maneira muito precisa e deliberada, sendo em seguida devolvido à célula viva, onde o efeito fenotípico de diferentes mutações poderá ser estudado. A Engenharia Genética inaugurou uma nova era no campo da mutagênese: enquanto os agentes mutagênicos naturais provocam mutações nos mais variados genes dentro da célula, é agora possível produzir *mutações sítio-dirigidas*, também chamadas de oligonucleotídeo-dirigidas. O procedimento básico consiste em sintetizar um pequeno oligonucleotídeo em fita simples, contendo a mutação pontual desejada e colocá-lo em presença do gene que se quer mutagenizar, clonado num vetor de fita simples. Num passo seguinte, o oligonucleotídeo servirá de primer para a DNA-polimerase, que irá sintetizar a 2.^a fita do vetor, inclusive o gene de interesse. Esse vetor de fita dupla, contendo agora uma das fitas mutada num sítio específico, será introduzido na bactéria hospedeira, onde será replicado, originando múltiplas cópias. A natureza semiconservativa do processo de replicação do DNA fará com que 50% das moléculas resultantes seja portadora da mutação em ambas as fitas. Há hoje inúmeras variações desse procedimento básico, que não iremos descrever aqui. É preciso entretanto ressaltar que a mutagênese sítio-dirigida tem um enorme potencial, tanto para a pesquisa básica quanto para a aplicada. De fato, através da análise de alterações introduzidas na seqüência de aminoácidos da molécula da proteína, pode-se "mapear" a molécula, descobrindo-se quais são os resíduos que constituem o sítio catalítico, os diferentes domínios de ligação ao substrato, etc. Em Biotecnologia, como há agora várias proteínas importantes sendo produzidas por microrganismos recombinantes, pode-se aplicar a mutagênese sítio-dirigida para obter uma proteína mais ativa, mais estável e que não apresente efeitos colaterais indesejados. É o que se chama de *Engenharia de Proteínas*, um campo novo e altamente promissor, que se tornou realidade graças à Engenharia Genética.

4.7 – Transformação genética da célula viva: diferentes sistemas hospedeiros do DNA recombinante

As características ideais que um organismo deve apresentar para ser utilizado como hospedeiro de genes clonados são: capacidade de crescer em meios de cultura pouco dispendiosos, ter crescimento rápido, ser estável em cultura e não ser patogênico. Os hospedeiros mais utilizados têm portanto sido alguns microrganismos, bem caracterizados do ponto de vista genético, tais como a bactéria *E. coli* e a levedura *S. cerevisiae*.

Até há pouco tempo, existia também a necessidade de se conhecer um método que permitisse a transformação genética de cada tipo de hospedeiro. Assim, para possibilitar a entrada de DNA em *E. coli*, foram inicialmente desenvolvidos protocolos empregando cloreto de cálcio e choque térmico. No caso de *S. cerevisiae*, o primeiro procedimento de transformação requeria a protoplastização (obtida por meio de enzimas hidrolíticas da parede celular),

seguida de regeneração dos protoplastos após o tratamento com o DNA. Esse procedimento extremamente laborioso pôde subsequenteemente ser substituído por uma técnica que emprega cloreto de lítio para fragilizar a parede. Entretanto, todos esses procedimentos mostraram ser altamente traumáticos para as células, deixando poucos sobreviventes, da ordem de 10^0 .

Foi recentemente desenvolvida uma nova técnica, chamada de *eletroporação*⁽¹⁶⁾, que permite que se transforme geneticamente qualquer tipo de célula, procariótica ou eucariótica, deixando cerca de 50% de sobreviventes. Para a eletroporação, as células são colocadas numa solução contendo o DNA e submetidas a um breve pulso elétrico, que provoca a abertura transitória de orifícios no envelope celular, por onde entrará o DNA.

4.7.1 – Hospedeiros procarióticos

O organismo mais utilizado até hoje continua sendo a bactéria *E. coli*, em virtude da grande quantidade de conhecimento acumulado sobre os seus mecanismos genéticos e bioquímicos. Entretanto, esse hospedeiro apresenta algumas desvantagens, principalmente quando se passa à produção em larga escala de proteínas recombinantes. Ocorre que essa bactéria é normalmente encontrada no trato intestinal humano e é potencialmente patogênica. Mesmo linhagens não patogênicas produzem endotoxinas, que podem contaminar os produtos, o que é particularmente problemático no caso de produtos farmacêuticos injetáveis como, por exemplo, a insulina. Além disso, essa bactéria não secreta eficientemente as proteínas para o meio, mas retém-nas no espaço periplasmático, o que em certos casos não é desejável.

Bacillus subtilis, uma bactéria gram positiva, tem também sido utilizada como hospedeira. Essa bactéria não é patogênica, não produz endotoxinas e é boa secretora, mas apresenta certos inconvenientes para a clonagem. O principal problema consiste na instabilidade estrutural e segregacional dos plasmídeos recombinantes, que não se mantêm após repiques sucessivos e sofrem intensa recombinação. Consequentemente, o DNA estrangeiro acaba se diluindo na população.

Evidentemente, no caso de hospedeiros procarióticos, devem ser utilizadas linhagens mutantes, que não produzam enzimas de restrição.

4.7.2 – Hospedeiros eucarióticos

O mais utilizado dos hospedeiros eucarióticos é a levedura *S. cerevisiae*, para a qual se desenvolveram vários tipos de vetores plasmidiais especializados. Trata-se de um organismo unicelular, não patogênico, e que apresenta a vantagem de ser capaz de realizar a maioria das modificações pós-tradução que as proteínas de mamíferos sofrem nas células de origem. Tais modificações incluem: remoção da metionina do terminal amino da proteína, acetilação do terminal amino, acilação, fosforilação e glicosilação. Além disso, a

levedura mostrou-se capaz de realizar corretamente o "folding" das proteínas de mamífero, indispensável para que estas adquiram a sua conformação tridimensional correta e, portanto, a sua plena atividade biológica. Um dos exemplos mais marcantes talvez seja o da montagem pela levedura de partículas do vírus da hepatite B. A partir da clonagem do gene de um dos antígenos de superfície desse vírus (HBsAg), a levedura não apenas sintetiza este antígeno, mas ainda monta uma partícula lipoprotéica multimérica complexa, muito semelhante ao envelope viral, resolvendo o problema de apresentação do antígeno, um dos principais problemas das vacinas de subunidades produzidas por DNA recombinante⁽¹⁷⁾. Essas partículas (destituídas de DNA do vírus) são altamente imunogênicas e permitiram o desenvolvimento da 1.ª vacina recombinante a ser liberada para uso humano. Essas características, associadas ao fato de que a levedura *S. cerevisiae* vem sendo explorada pelo homem há mais de 8.000 anos, para produzir alimentos (pão, cerveja e vinho), sem nunca ter se mostrado patogênica, tem levado à escolha deste organismo para a expressão de produtos de vertebrados de alto valor agregado, principalmente para aplicação terapêutica. Por outro lado, considerando que *S. cerevisiae* já é um organismo tradicionalmente empregado em processos biotecnológicos, o desenvolvimento da Engenharia Genética desta levedura também permitiu que se realizassem passos de melhoramento genético da própria célula hospedeira. Assim, por exemplo, foram obtidas linhagens recombinantes de *S. cerevisiae*, capazes de degradar amido, por meio da clonagem de genes que codificam enzimas amilolíticas em outros organismos⁽¹⁸⁾. A principal desvantagem que o sistema apresenta se refere aos rendimentos, que são significativamente inferiores em relação às bactérias. Ultimamente, outras leveduras além de *S. cerevisiae* estão sendo empregadas como hospedeiras, já que apresentam melhores rendimentos: as leveduras metilotróficas, como *Pichia pastoris* e *Pichia angusta* (ex-*Hansenula polymorpha*) são as mais bem estudadas até o momento.

Também são utilizadas como hospedeiras diversas linhagens de células de mamíferos em cultura. O sistema de células de mamíferos tem sido muito útil para estudos de genética humana, câncer, doenças infecciosas e da própria fisiologia destas células. Como não se conhecem plasmídeos para células de mamífero, os vetores disponíveis são sempre vírus. O vírus SV40, que causa tumores em primatas, foi o primeiro a ser utilizado, porque o seu genoma consiste de DNA de dupla fita circular e a sua sequência nucleotídica foi uma das primeiras a ser inteiramente conhecida. Foram construídos vetores derivados do SV40 que não induzem câncer, que continuam a ser muito utilizados. Por outro lado, também são utilizados retrovírus para a introdução de genes em células de mamífero, uma vez que estes vírus acabam se integrando nos cromossomos da célula hospedeira. Também é digno de menção o vírus vaccinia, um grande vírus de DNA de dupla fita, que vem sendo utilizado para a clonagem de diversos genes virais para a produção de vacinas. Para células de mamífero, além da eletroporação, empregam-se também os procedimentos de fusão de lipossomos e de microinjeção. O DNA pode ser incorporado a lipossomos – vesículas lipídicas artificiais – que se fundem à

membrana celular e liberam o seu conteúdo no citoplasma. Por sua vez, a microinjeção de DNA pode ser agora realizada com um aparelho computadorizado, que aumenta em aproximadamente 10 vezes o número de células que podem ser injetadas num único experimento. A principal desvantagem das células de mamífero é que o seu cultivo é caro, o que dificulta muito o escalonamento, além de se obter níveis de expressão relativamente baixos.

Ultimamente, o uso de células de inseto em cultura vem ganhando muita importância. As linhagens celulares de inseto são mais fáceis de cultivar e foram desenvolvidos vetores muito eficientes a partir de um vírus de DNA, o baculovírus, que infecta especificamente células de inseto. Altos níveis de expressão de diversas proteínas heterólogas estão sendo obtidos nesse sistema, utilizando-se o promotor do gene da poliedrina do baculovírus, proteína que é normalmente produzida em grandes quantidades pelas células infectadas.

Para a transformação genética de plantas, o vetor mais empregado é um plasmídeo bacteriano, chamado Ti, natural da bactéria *Agrobacterium tumefaciens*, agente patogênico, que é responsável pelo aparecimento de um tumor na planta. Durante o processo de transformação maligna da célula vegetal, uma parte do plasmídeo Ti, conhecida como T-DNA, é transferida da bactéria para a planta por um processo semelhante ao da conjugação bacteriana. Esse segmento do plasmídeo, correspondente a cerca de 10% do seu genoma, penetra no núcleo e integra-se em múltiplas cópias no DNA cromossômico da célula hospedeira. Conseqüentemente, inserindo-se o gene estrangeiro no T-DNA, este gene acabará também integrado no genoma da planta. Foram obtidos plasmídeos Ti mutantes, nos quais as propriedades tumorigênicas estão suprimidas, que vem sendo utilizados para a Engenharia Genética de plantas, num sistema que inclui um outro plasmídeo auxiliador. A principal limitação desse sistema é a especificidade do plasmídeo Ti para as dicotiledôneas. Sistemas alternativos, utilizando vírus de plantas, tais como os geminivírus, vírus de DNA que tem um largo espectro de hospedeiros e o vírus do mosaico dourado do tomate também estão sendo desenvolvidos. Entretanto, esses sistemas ainda não são muito eficientes. Também para as plantas, o método de transformação através de eletroporação mostrou-se muito útil, mas exige que sejam usados protoplastos. Para a transformação direta de células intactas, desenvolveu-se um sistema de biobalística. Nesse procedimento, esferas diminutas de tungstênio são recobertas com o DNA, para em seguida serem projetadas para dentro da célula, a uma velocidade de ~430m/s, por um revólver especial. Essa técnica apresenta ainda a vantagem de permitir a transformação dos cloroplastos dentro da célula vegetal, embora isto ocorra com uma eficiência 100 vezes menor do que a transformação do genoma nuclear.

4.8 – Questões de segurança e preservação ambiental

O desenvolvimento da Engenharia Genética foi extremamente frutífero para a Biotecnologia e um grande número de organismos recombinantes ou

GEMs (do inglês, Genetic Engineered Microorganisms) foram criados para diferentes finalidades. Entretanto, a própria rapidez com que essa ciência se desenvolve gera uma constante preocupação, por parte dos pesquisadores e da sociedade, com relação aos riscos inerentes à manipulação genética e a uma possível contaminação do meio ambiente por tais GEMs.

De fato, em alguns casos, foi verificado que os GEMs são capazes de interferir em populações microbianas e seus processos fisiológicos no solo. O principal ponto levantado sobre essa questão é o fato de muito pouco se conhecer sobre o comportamento desses organismos fora do laboratório e sobre o tipo de interferências ambientais que poderiam advir da recombinação genética ou mesmo de mutações que os GEMs viessem a sofrer em seguida à sua liberação na natureza. Um problema adicional que se apresenta é a falta de controle da nossa parte sobre a transferência de material genético de um organismo para outro, fenômeno corriqueiro, principalmente entre bactérias, através de processos como conjugação, transdução e transformação, que poderiam ocorrer entre os GEMs e os microrganismos naturais do meio ambiente.

Na verdade, os próprios descobridores das novas metodologias reconheceram desde logo os riscos potenciais que elas apresentavam, tendo tomado a iniciativa de organizar, já em 1975, a Conferência de Asilomar sobre Moléculas de DNA Recombinante, que teve como principal objetivo discutir as maneiras de se trabalhar com microrganismos geneticamente manipulados e buscar definições e estratégias para garantir a segurança dos pesquisadores e da população⁽¹⁹⁾. Definiram-se, naquela ocasião, regras de conduta bastante rígidas para que o trabalho científico fosse realizado com o mínimo de riscos para o pesquisador, a população e o ecossistema. Barreiras biológicas e físicas adequadas deveriam ser criadas para conter os novos microrganismos formados a partir do DNA recombinante. Felizmente, essa regulamentação foi posteriormente abrandada, para não tolher em demasia a liberdade dos pesquisadores, o que poderia vir a obstruir o progresso científico.

A meta principal do desenvolvimento de sistemas biológicos de contenção dos GEMs consiste na eliminação (ou, ao menos, em redução substancial) de tais populações microbianas introduzidas nos ecossistemas, uma vez que sua função já tenha sido completada. Duas diferentes abordagens se apresentam para o estabelecimento desses sistemas de confinamento: a) um mecanismo passivo baseado na debilitação da linhagem, tornando-a incapaz de sobreviver muito tempo fora das condições de laboratório. Assim, por exemplo, foi construída a linhagem mutante X1776 de *E. coli*, que, para a constituição da parede celular, necessita do ácido diaminopimélico, molécula raramente encontrada na natureza⁽²⁰⁾. Entretanto, essa estratégia apresenta a desvantagem de que essas linhagens perdem muito do seu vigor, mesmo em condições ótimas de laboratório, e, evidentemente, não se prestam para desenvolver algum tipo de tarefa no meio ambiente, onde não serão capazes de competir com a flora natural; b) um mecanismo ativo, pelo qual o tempo de vida da linhagem

seja controlado através da indução programada de uma proteína letal: o desempenho da linhagem é portanto normal, até o momento em que ela comete suicídio. Esse mecanismo de auto-destruição pode, em princípio, ser introduzido em qualquer linhagem sadia, que passaria então a carregar o gene capaz de desencadear a sua própria morte⁽²¹⁾.

Os genes assassinos, que vem sendo utilizados para o estabelecimento de tais *sistemas-suicidas*, são principalmente genes que interferem com a integridade da membrana celular, tais como os genes que codificam as proteínas da família Gef⁽²²⁾. Entretanto, foi verificado que o DNA liberado pelas células mortas persiste no meio ambiente por períodos de tempo suficientes para a sua transferência para outros microrganismos. Embora a transformação genética natural entre bactérias da mesma espécie seja conhecida há quase 70 anos, só recentemente foi comprovada a ocorrência de transformação genética no ambiente entre diferentes espécies bacterianas⁽²³⁾. Na verdade trata-se do mesmo fenômeno, onde ocorre a entrada, na célula bacteriana, de fragmentos de DNA livre (cromossômico ou plasmidial), que podem se incorporar no cromossomo da célula, de maneira que a informação genética acaba sendo transmitida às gerações subsequentes. Fragmentos de DNA livres no ambiente são continuamente produzidos por lise celular, formando agregados de DNA, que se distribuem em superfícies de minerais e outros sedimentos, como também em partículas suspensas nos habitats aquosos. Esse DNA extracelular pode transformar células competentes ou ser degradado pela atividade de DNases extra e intracelulares, sendo os produtos desta degradação então utilizados como nutrientes⁽²³⁾. Em consequência dessas descobertas, ultimamente vem sendo dada preferência a genes que codificam nucleases a construção de sistemas suicidas. No que se refere à função suicida, as nucleases apresentam vantagens sobre as proteínas da família Gef, uma vez que são capazes de degradar diretamente o material genético, além de destruir a fonte de todos os elementos celulares.

Evidentemente, o ponto crítico para a construção de um sistema suicida reside na regulação da expressão do gene assassino. Primeiramente, é importante que não haja "vazamento" da expressão do gene, ou seja, que só ocorra expressão após a indução. Em segundo lugar, é necessário conhecer as condições ambientais às quais ficará sujeito o GEM, para proceder-se à escolha do promotor regulável mais adequado. Entre diferentes alternativas, promotores que são induzidos por carência nutricional vêm merecendo especial atenção, já que, fora do laboratório, esta talvez seja a condição mais comumente encontrada pelo microrganismo.

Referências bibliográficas

1. JACKSON, D.A.; SYMONS, R.H.; BERG, P. Biochemical method for inserting new genetic information into DNA of Simian virus 40: Circular SV40 DNA molecules containing lambda phage genes and the galactose operon of *Escherichia coli*. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 69: 2904-09, 1972.

2. LURIA, S.E.; HUMAN, M.L., A nonhereditary, host-induced variation of bacterial viruses, *J. Bacteriol.* **64**:557-569, 1952.
3. SMITH, H.O.; WILCOX, K.W., A restriction enzyme from *Hemophilus influenzae*, I. Purification and general properties, *J. Mol. Biol.* **51**:379-91, 1970.
4. COHEN, S.; CHANG, A.; BOYER, H.; HELLING, R. Construction of biologically functional bacterial plasmids *in vitro.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70**:3240-44, 1973.
5. BOLIVAR, P.; RODRIGUEZ, R.; GREENE, P.J.; BETLACH, M.; HEYNEKER, H.L.; BOYER, H.W.; CROSA, J.; FALKOW, S. Construction and characterization of new cloning vehicles, II. A multipurpose cloning system. *Gene* **2**:95-113, 1977.
6. SCHENBERG, A.C.G.; BONATELLI JR, R. Plasmídeos de Eucariontes, In: COSTA, S.O.P. *Genética Molecular e de Microrganismos*, São Paulo, Editora Manole, 1987, p.493-509.
7. ITAKURA, K.; HIROSE, T.; CREA, R.; RIGGS, A.D.; HEYNEKER, H.L.; BOLIVAR, F.; BOYER, H.W. Expression in *Escherichia coli* of a chemically synthesized gene for the hormone somatostatin, *Science* **198**:1056-63, 1977.
8. SAIKI, R.K.; SCHARF, S.J.; FALOONA, F.; MULLIS, K.B.; HORN, G.T.; ERLICH, H.A.; ARNHEIM, N. Enzymatic amplification of beta-globin sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia, *Science* **230**:1350-54, 1985.
9. GOEDDEL, D.V.; KLEID, D.G.; BOLIVAR, F.; HEYNEKER, H.L.; YANSURA, D.G.; CREA, R.; HIROSE, T.; KRASZEWSKI, A.; ITAKURA, K.; RIGGS, A.D. Expression of chemically synthesized genes for human insulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**:106-10, 1979.
10. TALMADGE, K.; GILBERT, W. Cellular location affects protein stability in *Escherichia coli*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**:1830-3, 1982.
11. RATZKIN, B.; CARBON, J. Functional expression of cloned yeast DNA in *Escherichia coli*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**:487-91, 1977.
12. ROUGEON, F.; KOURILSKY, P.; MACH, B. Insertion of the rabbit β -globin gene sequence into *E. coli* plasmid, *Nucleic Acids Res.* **2**:2365-78, 1975.
13. NG, R.; ABELSON, J. Isolation and sequence of the gene for actin in *Saccharomyces cerevisiae*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**:3912-16, 1980.
14. MONTGOMERY, D.L.; HALL, B.D.; GILLAM, S.; SMITH, M. Identification and isolation of the yeast cytochrome c gene. *Cell* **14**:673-80, 1978.
15. SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R., DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**:5463-67, 1977.
16. SHIGEKAWA, K.; DOWER, W.J., Electroporation of eukaryotes and prokaryotes: A general approach to the introduction of macromolecules into cells, *BioTechniques* **6**:742-51, 1988.
17. VALENZUELA, P.; MEDINA, A.; RUTTER, W.J.; AMMERER, G.; HALL, B.D. Synthesis and assembly of hepatitis B virus surface antigen particles in yeast. *Nature* **298**:347-50, 1982.
18. SCHENBERG, A.C.G.; VICENTE, E.J.; ASTOLFI-FILHO, S. Expression of heterologous amylases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Ciência & Cultura* **45**:181-191, 1993.
19. BERG, P.; BALTIMORE, D.; BRENNER, S.; ROBLIN III, R.O.; SINGER, M. F. Asilomar Conference on Recombinant DNA Molecules. *Science* **188**:991-4, 1975.
20. CURTISS, R. III; INOUE, R.M.; PEREIRA, D.; HSU, J.C.; ALEXANDER, L.; ROCK, L. Construction and use of safer bacterial host strains for recombinant DNA research. In: SCOTT, W.A., WERNER, R., *Molecular Cloning of Recombinant DNA*, Academic Press, New York, 1977, p.248-69.

21. MOLIN, S.; KLEMM, P.; POULSEN, L.K.; BIEHL, H.; GERDES, K.; ANDERSSON, P. Conditional suicide system for containment of bacteria and plasmids. **Bio/Technology** 5:1315-18, 1987.
22. POULSEN, L.K.; LARSEN, N.W.; MOLIN, S.; ANDERSSON, P. A family of genes encoding a cell-killing function may be conserved in all gram-negative bacteria. **Mol.Microbiol.**3:1463-72, 1989.
23. LORENZ, M.G.; WACKERNAGEL, W. Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. **Microbiol. Revs.**58:563-602, 1994.

Leitura recomendada

- WATSON, J.D.; GILMAN, M.; WITKOWSKI, J.; ZOLLER, M., **Recombinant DNA**, 2nd Edition, Scientific American Books, W.H. Freeman and Company, New York, 1992.
- OLD, R.W.; PRIMROSE, S.B., **Principles of Gene Manipulation, an Introduction to Genetic Engineering**, 4th Edition, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1989.

5

ELEMENTOS DE ENZIMOLOGIA

Bayardo B. Torres

5.1 – Introdução

Uma reação química pode ser analisada quanto à sua *termodinâmica* ou quanto à sua *cinética*. A Termodinâmica estuda a viabilidade e a reversibilidade das reações, a partir da análise do conteúdo energético dos estados inicial e final de uma transformação — no caso das reações químicas, o conteúdo energético dos produtos e reagentes. Nada esclarece, porém, sobre a velocidade com que a transformação ocorre. Essa informação é dada pela Cinética. Uma reação química pode ser termodinamicamente viável (isto é, se ocorrer, o conteúdo energético dos produtos será menor do que o dos reagentes) mas não se efetivar em determinadas condições (ou seja, ter velocidade igual a zero ou muito próxima de zero). Nos parâmetros termodinâmicos, os organismos não podem interferir. Como será visto adiante, sua intervenção incide exclusivamente sobre o aspecto cinético, isto é, sobre a velocidade das reações.

Tomando o exemplo simples da conversão irreversível de uma substância *A* em *B* ($A \rightarrow B$), a *velocidade da reação* (*V*) será:

$$V = \frac{d[B]}{dt} \quad \text{ou} \quad V = -\frac{d[A]}{dt}$$

A unidade de *V* é moles por litro por segundo, se [*B*] e [*A*] representarem as concentrações molares de *B* e de *A*.

A última equação mostra que a velocidade da reação diminui à medida que a reação prossegue e a concentração de *A* diminui. A velocidade é, portanto, proporcional à concentração de *A*:

$$V = -\frac{d[A]}{dt} = k[A]$$

A constante k é chamada *constante de velocidade* da reação, com unidade de s^{-1} . Essa é uma reação de *primeira ordem*, já que sua velocidade depende da concentração do reagente com expoente 1.

A maior parte das reações químicas processadas nos organismos são mais complexas, por envolverem pelo menos três moléculas diferentes e por serem, geralmente, reversíveis. São reações de *segunda ordem*, representadas, por exemplo, por



para as quais, pode-se demonstrar, as velocidades de reação serão, respectivamente

$$V = k[A]^2 \quad \text{e} \quad V = k[A][B]$$

Nesses casos, a velocidade da reação é explicada pela *teoria das colisões*. Essa teoria estabelece que, para reagir, as moléculas presentes em uma solução devem colidir com orientação apropriada e que a colisão deve levá-las a adquirir uma quantidade mínima de energia que lhes permita atingir um estado reativo, chamado *estado de transição*. Para levar todas as moléculas de um mol de uma substância até o estado de transição, necessita-se de uma quantidade de energia definida como *energia de ativação*. Essa energia é, portanto, a barreira que separa os reagentes dos produtos. A decorrência direta desse modelo é que a velocidade das reações pode ser aumentada pelo menos de três maneiras diferentes: (1) aumentando o número de moléculas em solução, ou seja, sua concentração, como previsto pela equação da velocidade; (2) aumentando o número de choques entre as moléculas; (3) diminuindo a barreira imposta pela energia de ativação.

Em uma população de moléculas, nem todas têm o mesmo conteúdo energético em um dado instante. Algumas têm conteúdo muito pequeno, outras muito grande, e a maioria apresenta um conteúdo médio, característico da temperatura na qual a população se encontra. Quando se eleva a temperatura de um sistema, as moléculas, no seu conjunto, adquirem um conteúdo energético maior [Fig. 5.1 (a)], mas é respeitado o mesmo padrão de distribuição de energia entre elas. Como em um sistema qualquer, a velocidade da reação será diretamente proporcional ao número de moléculas com energia igual ou maior do que a energia do estado de transição, o aumento da temperatura de um sistema acarreta uma maior velocidade da reação química [Fig. 5.1 (b)]. Por outro lado, se a energia de ativação necessária para a reação ocorrer for menor, mesmo mantida a temperatura inicial, um número maior de moléculas conterá energia maior do que a do estado de transição e estará, portanto, em condições de reagir [Fig. 5.1 (c)]; neste caso, a velocidade de reação também será aumentada.

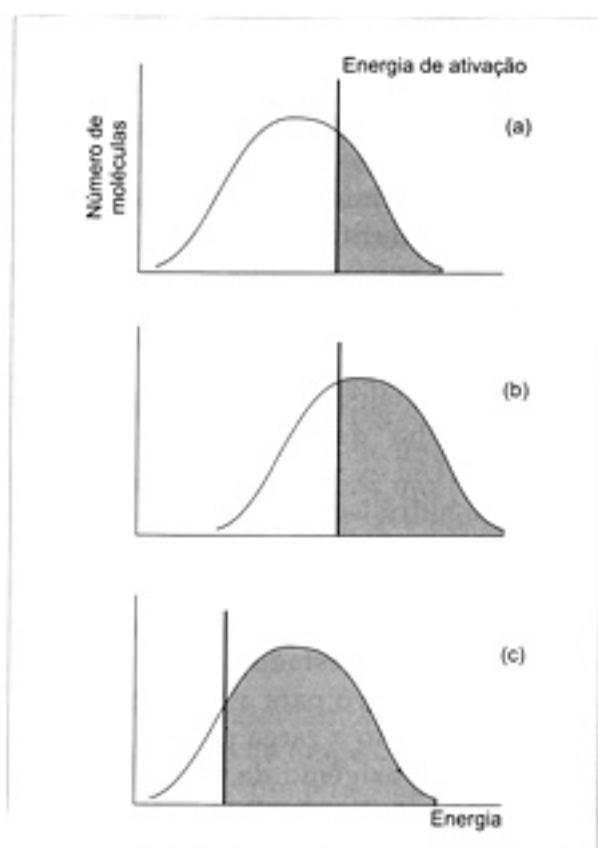


Figura 5.1 – Esquema da distribuição de energia entre as moléculas componentes de um sistema; a barra vertical assinala o valor da energia de ativação e a área hachurada representa a população de moléculas com energia suficiente para reagir. (a) Distribuição de energia em uma dada temperatura T . (b) Distribuição de energia em uma temperatura T_1 , maior do que T . (c) Distribuição de energia de um sistema na temperatura T , mostrando a alteração provocada no valor da energia de ativação pela introdução de um catalisador.

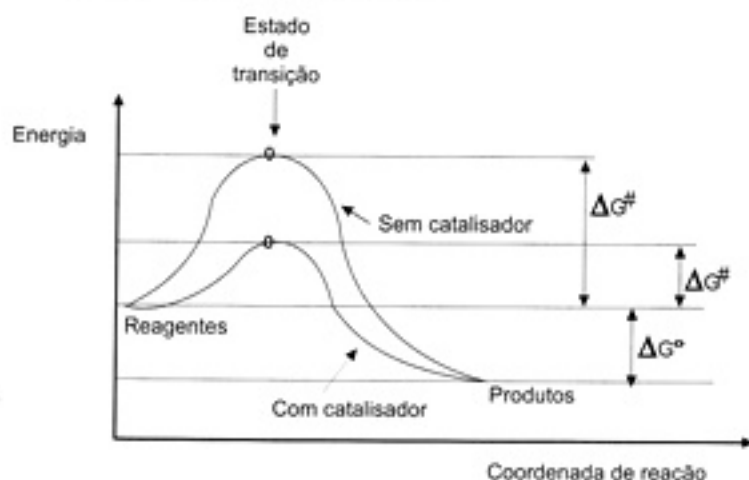


Figura 5.2 – Diagrama da reação química com e sem catalisador. São assinaladas a energia livre padrão da reação (ΔG°), ou seja, a diferença entre o conteúdo energético dos produtos e dos reagentes, e a energia de ativação ($\Delta G^\#$).

A redução no valor da energia de ativação pode ser obtida pela presença de *catalisadores*, compostos capazes de aumentar a velocidade da reação sem alterar a proporção entre reagentes e produtos encontrada no final da reação e sem serem efetivamente consumidos durante o processo. Podem, portanto, atuar em quantidades mínimas, ditas *catalíticas*, várias ordens de grandeza menores do que a concentração dos reagentes. O catalisador participa efetivamente da reação, sofrendo alterações de sua estrutura química durante o processo; invariavelmente, porém, retorna à sua forma original no final da reação.

O processo pelo qual os catalisadores aceleram uma reação química consiste em criar um novo "caminho" de reação, para o qual a energia de ativação requerida é menor (Fig. 5.2). Um exemplo simples desse novo caminho é mostrado na Fig. 5.3, através da hidrólise de um éster catalisado por íons H^+ . A reação consiste no ataque do oxigênio (que tem carga residual negativa), pertencente à molécula de água, ao carbono presente no éster (que tem carga residual positiva, em virtude de sua dupla ligação com o oxigênio). A energia de ativação requerida para atingir o estado de transição é alta. A presença dos íons H^+ cria um caminho alternativo para a reação: o íon H^+ liga-se ao oxigênio presente no éster, aumentando a carga positiva do carbono e tornando-o mais susceptível ao ataque do oxigênio da água. Para esse novo caminho a energia necessária é menor e, portanto, em uma mesma temperatura, mais moléculas poderão reagir e a velocidade da reação será aumentada pela presença de H^+ . Seguindo modelo semelhante, muitas reações químicas poderão ser aceleradas por íons OH^- , por íons de metais, etc.

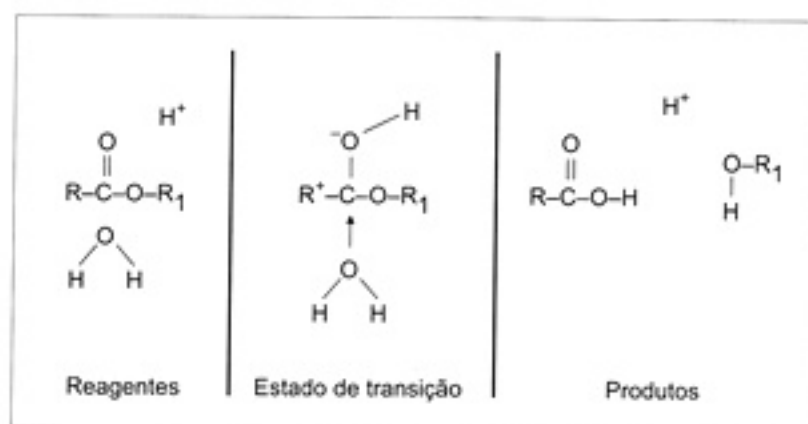


Figura 5.3 – Mecanismo da hidrólise de um éster catalisada por H^+ . A presença do íon altera a distribuição de cargas elétricas do éster, criando um caminho de reação que necessita energia de ativação menor do que o da reação não catalisada.

Praticamente todas as reações químicas que se processam nos organismos são catalisadas. Os catalisadores biológicos são proteínas chamadas *enzimas*. A catálise das reações biológicas é imprescindível para a conservação e reprodução dos seres vivos, uma vez que a maioria das reações químicas que ocorrem nos organismos têm, na ausência de catalisadores, velocidades muito baixas. É comum encontrarmos nas células reações que, na ausência de catalisadores, demoram várias horas, dias ou anos para completarem-se ou têm velocidades iguais a zero, quando medidas em tempo finito. Por exemplo, a oxidação de glicose a CO_2 tem velocidade praticamente nula: pode-se conservar uma solução de glicose em contato com o oxigênio do ar por muito tempo, sem que sua concentração seja perceptivelmente alterada. Nas células, entretanto, graças à presença de enzimas, a reação completa-se em minutos. O fato de muitos microrganismos multiplicarem-se com velocidades de divisão menores do que uma hora, só é possível pela catálise de suas reações. De fato, as reações catalisadas por enzimas têm *velocidades muito altas*, entre 10^6 a 10^{12} vezes maiores que as reações não catalisadas e algumas ordens de grandeza maiores que as reações catalisadas por catalisadores inorgânicos.

Além disso, as enzimas apresentam sobre os catalisadores inorgânicos outras vantagens. Como será visto ao longo deste capítulo, graças à sua estrutura complexa, podem apresentar um *alto grau de especificidade*, propriedade ausente nos catalisadores inorgânicos e, portanto, sua presença permite a seleção das reações que poderão ocorrer em um organismo, ainda que milhares de compostos diferentes estejam presentes no interior das células. É também devido às propriedades estruturais das proteínas que a *regulação da atividade enzimática* se processa, permitindo um ajuste contínuo da velocidade da reação catalisada às condições celulares vigentes. Além disso, as enzimas são, geralmente, *sintetizadas nas próprias células* onde atuam e sua concentração celular também está sob rígido controle.

Resumindo, as enzimas (1) diminuem a energia de ativação, levando a altas velocidades de reação, (2) são muito específicas, (3) são sintetizadas pelas próprias células onde atuam, (4) têm concentração celular variável, de acordo com as condições fisiológicas e (5) podem ter sua atividade modulada, permitindo um ajuste fino do metabolismo ao meio ambiente. O conjunto desses aspectos favoráveis justifica o alto investimento energético necessário para a síntese de enzimas e possibilita a manutenção da vida como a conhecemos.

5.2 – Estrutura das enzimas

A melhor compreensão das características e propriedades das enzimas depende do conhecimento de sua estrutura. As enzimas são proteínas globulares e, como todas as proteínas, são heteropolímeros de vinte diferentes

aminoácidos; algumas incluem em sua estrutura um componente não-protéico, designado *grupo prostético*. São macromoléculas, com peso molecular variando entre cerca de 5.000 a até mais de 1.000.000 de daltons. Dalton é uma unidade de massa, equivalente a 1/12 da massa de um átomo de carbono 12. Com exceção da prolina, os aminoácidos componentes das proteínas (Fig. 5.4) apresentam uma porção comum: um átomo de carbono ligado a uma carboxila, a um grupo amino e a um átomo de hidrogênio. O quarto substituinte do carbono é uma cadeia, chamada grupo R, específica para cada aminoácido. As propriedades particulares de cada aminoácido são dadas, portanto, pelo grupo R.

5.2.1 – Estrutura primária

Na molécula protéica, os aminoácidos estão ligados uns aos outros através da ligação peptídica (Fig. 5.5), estabelecida entre o grupo α -carboxila de um aminoácido e o grupo α -amino do aminoácido subsequente, formando uma longa cadeia.

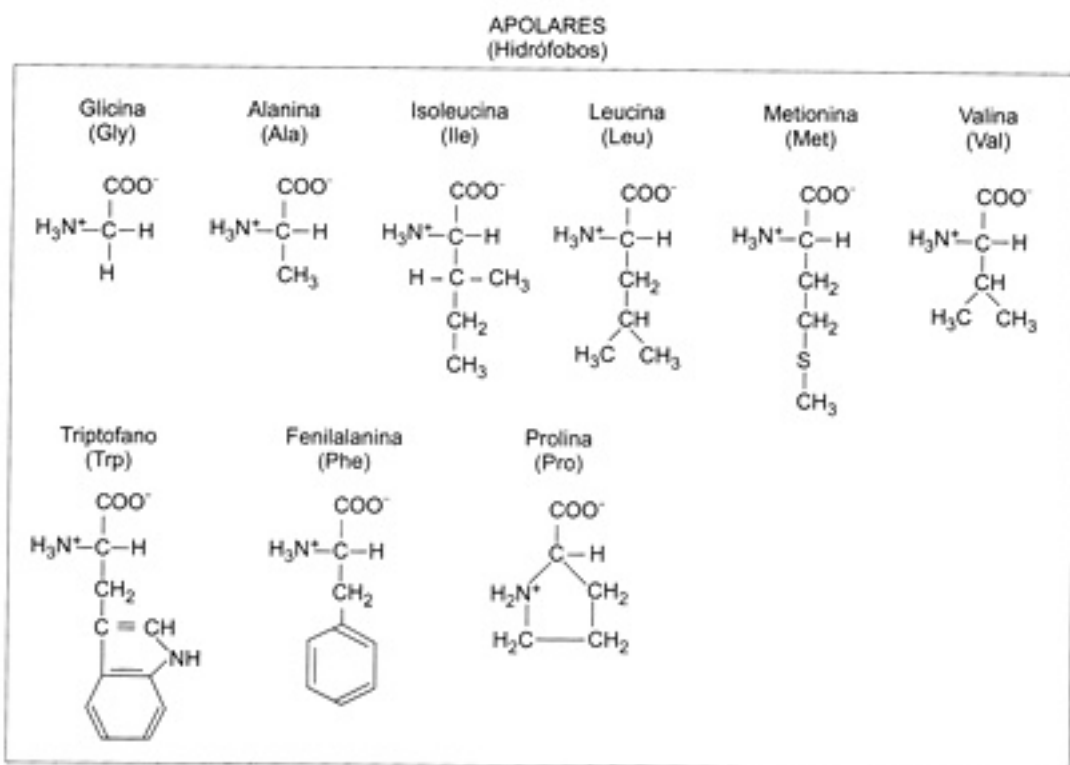


Figura 5.4 – Aminoácidos presentes nas proteínas, com a forma predominante encontrada a pH = 7. São chamados aminoácidos ácidos aqueles que apresentam carga elétrica líquida negativa nesse pH e aminoácidos básicos, os que têm carga positiva. Os aminoácidos apolares apresentam um grupo R hidrofóbico. Os aminoácidos polares sem carga têm a molécula polar, mas sem apresentar carga elétrica efetiva. Notar que o grupo α -amino de todos os aminoácidos está voltado para a esquerda, explicitando tratar-se do isômero L. Aminoácidos D não são encontrados nas proteínas de qualquer ser vivo. A prolina é um aminoácido com uma estrutura especial, em que não existe grupo amino. É, a rigor, um aminoácido.

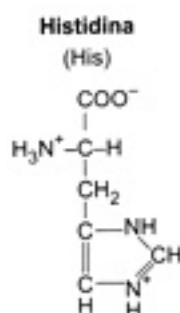
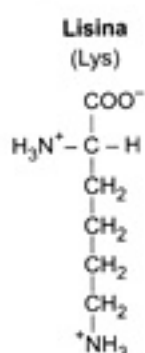
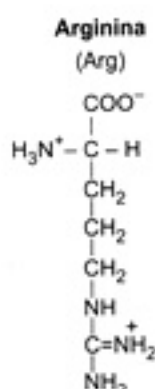
Note-se que essa ligação é sempre feita com os grupos α ; grupos carboxila e grupos amino presentes no radical R (como no glutamato, aspartato e lisina) jamais participam da ligação peptídica. Portanto, uma cadeia protéica composta por, por exemplo, 150 aminoácidos, terá uma extremidade em que o grupo α -amino do primeiro aminoácido estará livre e outra em que a α -carboxila do último aminoácido também estará livre. Por convenção, a cadeia de aminoácidos é sempre escrita iniciando-se com o aminoácido que tem o grupo α -amino livre.

O que caracteriza cada enzima é o *número* de aminoácidos componentes de sua cadeia e a *ordem* em que eles se encontram, ou seja, a sua *estrutura primária*. Assim, apesar de constituídas por apenas 20 aminoácidos diferentes, as possibilidades de estruturas diversas para as proteínas são muito grandes. Como se verá em seguida, a estrutura primária é responsável pelas estruturas de ordem superior que a proteína exibe em sua forma celular, ou *nativa*.

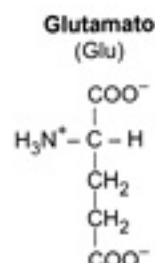
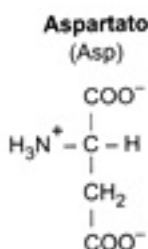
POLARES

(Hidrófilos)

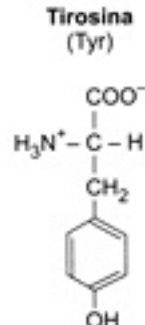
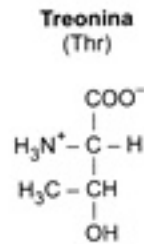
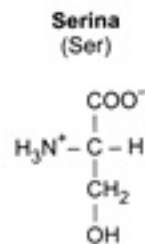
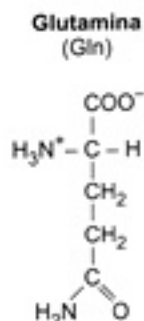
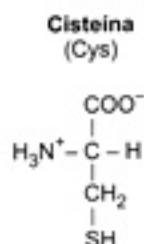
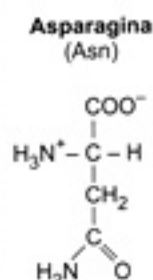
Polares com carga positiva (Básicos)



Polares com carga negativa (Ácidos)



Polares sem carga



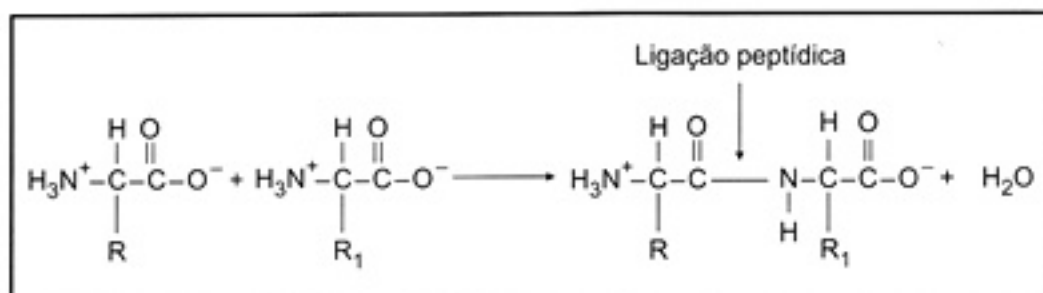
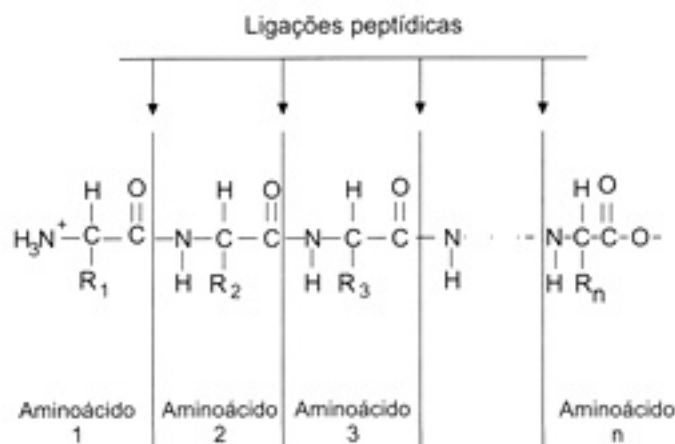


Figura 5.5 – Esquema da formação da ligação peptídica, representada pelo traço mais longo. Essa reação jamais acontece nas células; o processo que leva à sua formação é muito complexo, envolvendo toda a maquinaria celular de síntese protéica, que inclui diferentes tipos de RNA, ribossomos, etc. O esquema representa apenas o resultado parcial do processo.

Note-se que a monotonia da estrutura protéica é apenas aparente. A diversidade dos radicais R e as ligações químicas que ocorrem entre eles farão com que cada tipo de proteína, com sua estrutura primária própria, apresente uma conformação espacial que lhe é peculiar e lhe permite exercer sua função, que é dependente da sua forma. De fato, a cadeia peptídica linear, como está representada abaixo, não existe em solução.

A cadeia peptídica pode ser, portanto, representada assim:



5.2.2 – Estrutura secundária

Dois tipos diferentes de organização regular, chamadas estruturas secundárias, são encontradas nas enzimas. A cadeia peptídica pode ter segmentos organizados em α -hélice. Essa estrutura é formada e estabilizada por pon-

tes de hidrogênio estabelecidas entre o átomo de nitrogênio e o átomo de oxigênio (Fig. 5.6).

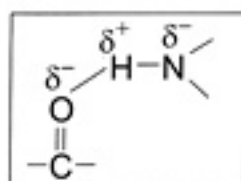


Figura 5.6 – Ponte de hidrogênio, formada com os elementos da ligação peptídica. A ponte de hidrogênio é uma ligação muito fraca em comparação à ligação covalente mas, como existe em grande número, tem papel importante na estrutura protéica.

Cada ligação peptídica oferece os elementos para a formação da ponte de hidrogênio: um átomo de hidrogênio covalentemente ligado ao nitrogênio e o oxigênio, preso ao carbono por uma dupla ligação. Cada ponte de hidrogênio é uma ligação fraca, mas o grande número dessas interações confere muita estabilidade à estrutura que mantêm. As ligações constituintes do eixo da cadeia protéica não têm ângulos de 180° , como o esquema apresentado acima sugere. Os átomos dispõem-se espacialmente como pertencentes a uma hélice, com 3,6 aminoácidos por volta, de tal forma que a ligação por ponte de hidrogênio é estabelecida entre os átomos constituintes de uma ligação peptídica qualquer e os átomos da quarta ligação peptídica subsequente, que a volta da hélice aproximou da primeira (Fig. 5.7). As pontes de hidrogênio dispõem-se paralelamente ao eixo da hélice e os grupos R projetam-se para o seu exterior.

O segundo tipo de estrutura secundária encontrada nas proteínas é chamada *folha β -pregueada* (Fig. 5.8). Essa estrutura é formada por um arranjo paralelo de dois ou mais segmentos de cadeias peptídicas quase totalmente distendidas e também é mantido por pontes de hidrogênio formadas pelos mesmos elementos que constituem as pontes de hidrogênio da α -hélice. Nesse caso, porém, a ponte de hidrogênio une dois segmentos distintos da cadeia protéica, e situa-se em posição perpendicular ao eixo da cadeia polipeptídica.

Deve-se notar que a estrutura secundária tem sempre um padrão regular, já que é formada por elementos derivados de outra estrutura absolutamente regular na cadeia protéica, a ligação peptídica. As enzimas apresentam, em sua conformação espacial, as duas estruturas secundárias descritas. Parte da cadeia está organizada em α -hélice, parte em folha β -pregueada e aparecem ainda regiões de conformação irregular, conectando os segmentos com arranjo definido (Fig. 5.9).

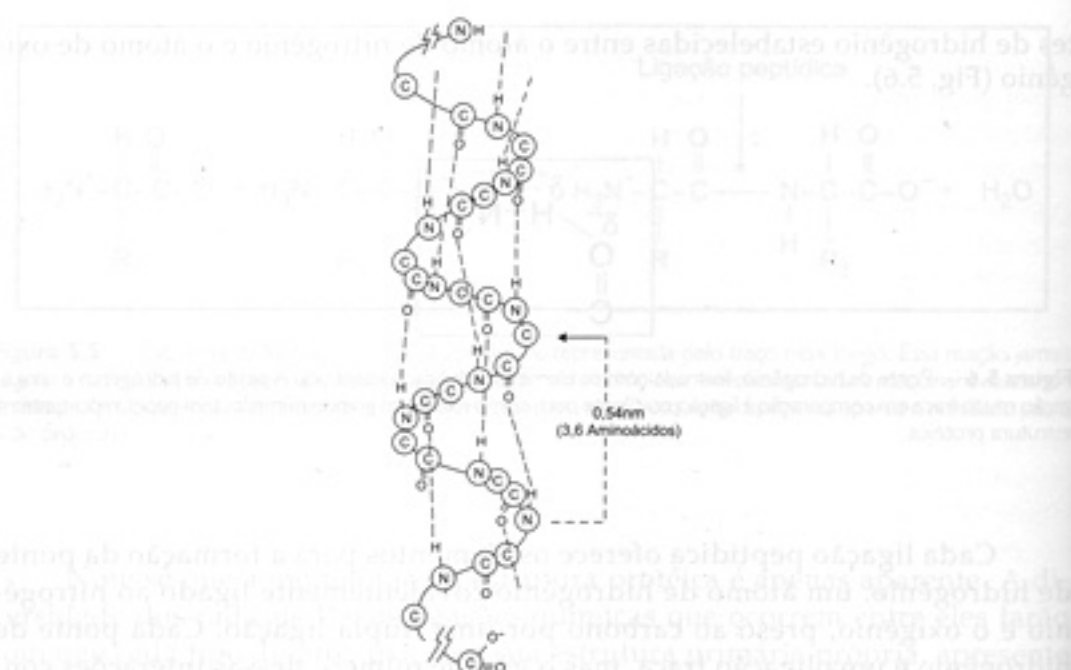


Figura 5.7 – Esquema da α -hélice, estabilizada por pontes de hidrogênio, dispostas perpendicularmente à cadeia polipeptídica.

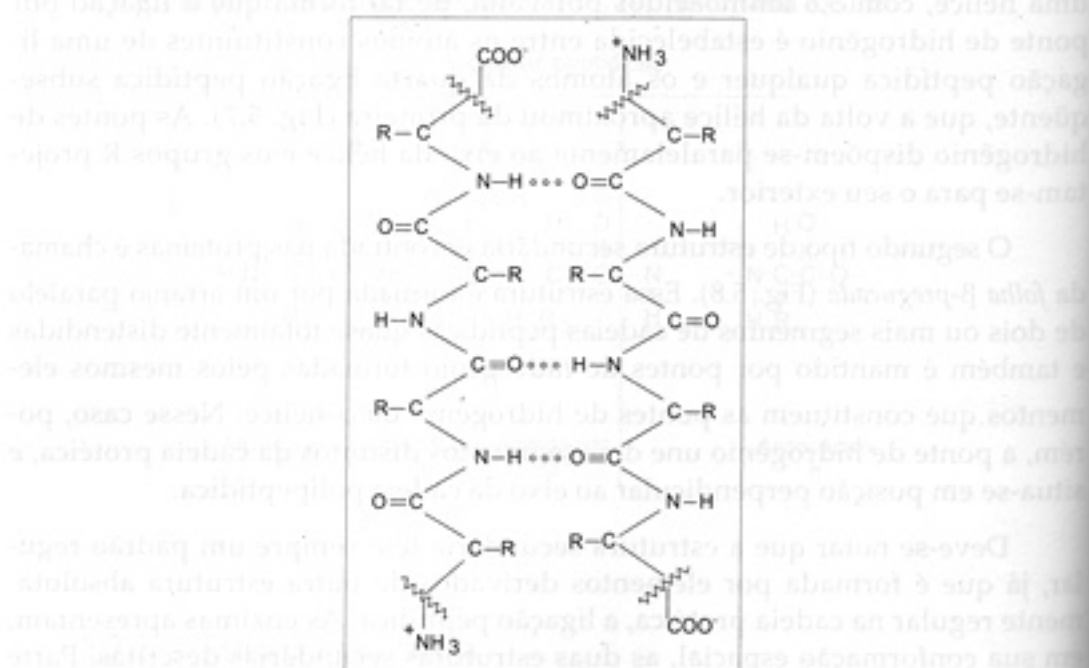


Figura 5.8 – Esquema da folha β -pregueada, estabilizada por pontes de hidrogênio formadas entre dois segmentos da cadeia polipeptídica e dispostas perpendicularmente a ela.

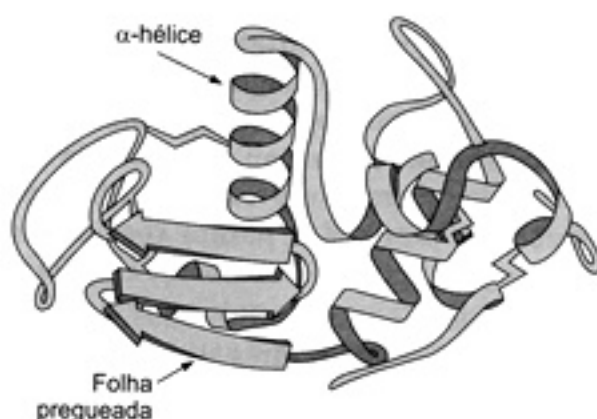


Figura 5.9 – Estrutura da lisozima, indicando segmentos em α -hélice, segmentos em folha β -pregueada (indicados por setas) e regiões sem estrutura regular.

5.2.3 – Estrutura terciária

A estrutura terciária descreve a conformação tridimensional que a molécula protéica assume em solução. É sua conformação real, pois os níveis inferiores de organização têm apenas interesse didático, não existindo proteína que contenham apenas aquelas estruturas. A estrutura terciária explica o dobramento da cadeia peptídica com os enrolamentos, dobras e voltas que compõem e que a levam a uma forma geral globular. As ligações químicas que estabelecem e mantêm a estrutura terciária são formadas sempre entre os grupos R dos aminoácidos. Como esses aminoácidos variam em número e posição para cada enzima considerada, a organização espacial também varia para cada enzima. As forças químicas, porém, são comuns a todas. Para entender o enovelamento da cadeia protéica, deve-se notar, em primeiro lugar, que os grupos R dos aminoácidos podem ser divididos em dois tipos (Fig. 5.4). Cerca de metade deles são apolares e, portanto, hidrofóbicos. Os outros são polares. Entre estes, alguns apresentam carga elétrica líquida (positiva ou negativa) e os restantes, embora não tenham carga elétrica, são polares por apresentar regiões do grupo R mais negativas (como o oxigênio da serina e da treonina e o enxofre da cisteína) e regiões mais positivas (como o átomo de hidrogênio ligado àqueles átomos negativos). Como a água é um solvente polar, os grupos R apolares tendem sempre a aproximar-se uns dos outros (de forma a excluir a água) e, no seu conjunto, situam-se voltados para o interior da molécula, enquanto os grupos polares voltam-se para a superfície. Essa localização diferencial dos grupos R, provocada pelas *interações hidrofóbicas*, constitui uma força poderosa de dobramento da cadeia polipeptídica.

Outras forças devem também ser consideradas. Grupos R com carga elétrica positiva (presentes em lisina e arginina) fazem ligações eletrostáticas

com grupos R com carga negativa (aspartato e glutamato). Esse tipo de ligação, também chamada *salina* ou *iônica*, é encontrada mais freqüentemente na superfície da molécula enzimática, por formar-se entre radicais hidrofílicos; pode, porém, estar localizada no seu interior, porque grupos com carga elétrica situados em um segmento predominantemente hidrofóbico da cadeia polipeptídica são seqüestrados para a região interna da molécula pela interiorização da região apolar. Outra força importante de dobramento da α -hélice são *pontes de hidrogênio*, formadas entre grupos R. Note-se que essas pontes, ao contrário das pontes de hidrogênio da estrutura secundária, não apresentam qualquer padrão regular, pois a localização dos grupos R capazes de oferecer os elementos para a formação da ponte de hidrogênio estão distribuídos irregularmente ao longo da cadeia peptídica segundo a estrutura primária da enzima.

As interações referidas até aqui como responsáveis pela estrutura tridimensional das enzimas são todas forças fracas. Mas pode ser encontrada também uma ligação covalente fazendo parte das ligações que mantêm a estrutura terciária das proteínas: são as *pontes dissulfeto*, ou pontes S-S. Essas ligações são formadas por oxidação de dois grupos -SH, cada um dos quais presente na cadeia lateral de um *resíduo* de cisteína, o único aminoácido a apresentar -SH no grupo R. Designa-se *resíduo* de aminoácido à fração da molécula de aminoácido efetivamente inserida na cadeia protéica. Nem toda a molécula do aminoácido está presente, porque alguns átomos foram eliminados na formação da ligação peptídica.

É importante ressaltar que a forma espacial da enzima, responsável pela sua função, é resultado indireto de sua estrutura primária. Uma mutação que levasse à troca de um único aminoácido da longa cadeia polipeptídica de uma enzima poderia acarretar sua completa inativação, se o grupo R do "novo" aminoácido não puder estabelecer uma ligação de estrutura terciária essencial para a conformação correta da enzima. De fato, é fácil prever, por exemplo, as conseqüências para a estrutura terciária da substituição de um resíduo de glutamato (com grupo R negativo) por um resíduo de lisina (com grupo R positivo). A Fig. 5.10 ilustra as principais ligações da estrutura terciária.

5.2.4 – Estrutura quaternária

Os termos polipeptídio e proteína não são sinônimos. *Polipeptídio* é a cadeia constituída pelos aminoácidos ligados por ligações peptídicas; tem, portanto, uma acepção estrutural. A palavra *proteína* está associada a uma função. Muitas enzimas são constituídas por uma única cadeia polipeptídica, organizada espacialmente pelas forças químicas já descritas e, por te-

rem uma função, são, é claro, consideradas proteínas. Outras enzimas são formadas por duas ou mais cadeias polipeptídicas, iguais ou diferentes, que isoladamente não têm capacidade catalítica; nestes casos, o termo proteína só pode ser aplicado ao conjunto funcional, e não às subunidades (Fig. 5.11). Estrutura quaternária é a organização presente nas proteínas compostas por mais de uma cadeia polipeptídica e descreve quantos e quais monômeros compõem a molécula e como estes monômeros estão associados. As forças que mantêm unidos os monômeros componentes de enzimas com estrutura quaternária são as mesmas que mantêm a estrutura terciária, ou seja, interações hidrofóbicas, pontes de hidrogênio e ligações salinas, formadas, entretanto, entre grupos R de aminoácidos pertencentes a cadeias polipeptídicas diferentes. A exceção são as pontes dissulfeto, ausentes da estrutura quaternária.

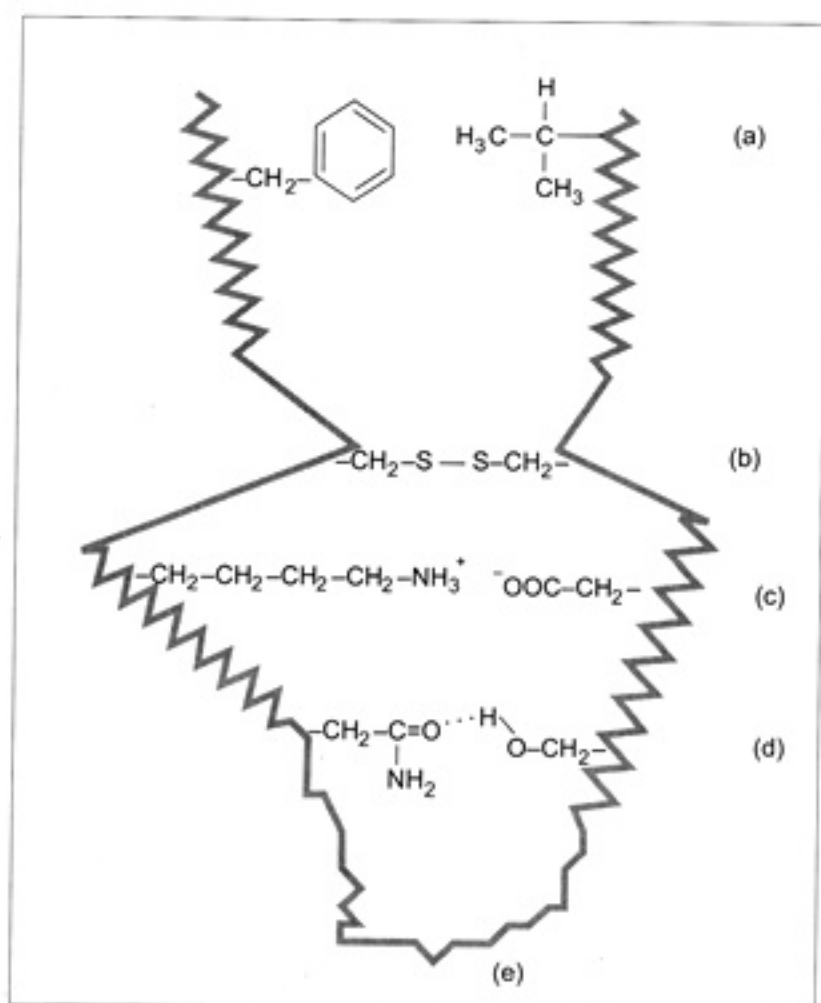


Figura 5.10 – Esquema das principais ligações responsáveis pela estrutura terciária das enzimas. (a) interação hidrofóbica; (b) ponte dissulfeto; (c) ligação eletrostática; (d) ponte de hidrogênio; (e) região sem estrutura definida.

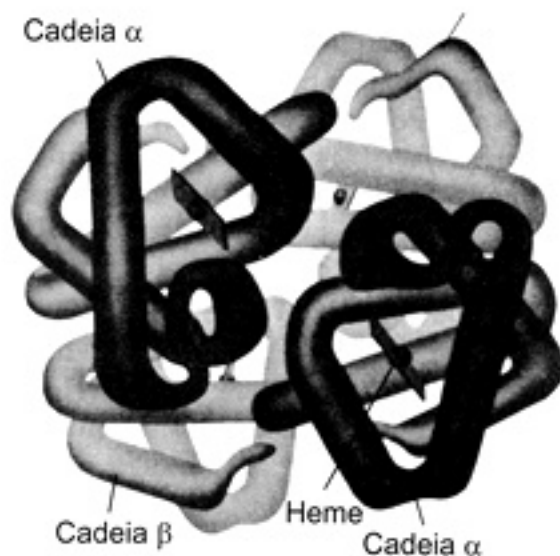


Figura 5.11 – Estrutura quaternária da hemoglobina (uma proteína não-enzimática), composta por quatro cadeias polipeptídicas, iguais duas a duas.

5.3 – Ação catalítica das enzimas

A partir da estrutura protéica pode-se entender melhor as propriedades catalíticas das enzimas. O primeiro ponto a considerar é a grande diferença de tamanho entre a enzima e seus substratos. Um exemplo numérico: a enzima urease, que catalisa a reação de hidrólise da uréia, tem peso molecular aproximado de 500.000 dáltons, enquanto a uréia tem peso molecular de 60 e a água de 18. O investimento energético para a síntese de uma molécula protéica tão grande justifica-se pela obtenção de uma estrutura muito precisa, com reentrâncias de forma apropriada e com grupos químicos localizados em posições exatas para servir à catálise. Para que esta seja exercida, os reagentes (aqui chamados *substratos*) devem ligar-se à molécula da enzima em uma região específica de sua superfície, chamada *sítio ativo*. O sítio ativo é uma cavidade com forma definida, aberta na superfície da molécula globular da enzima, constituída por grupos R de aminoácidos que podem estar distanciados na estrutura primária da proteína, mas que os dobramentos da estrutura terciária trouxeram à proximidade uns dos outros. É essa forma definida do sítio ativo que confere *especificidade* à catálise enzimática: para ser reconhecida como substrato uma molécula deve ter a forma adequada para acomodar-se no sítio ativo e os grupos químicos capazes de estabelecer ligações com os grupos R ali presentes (Fig.5.12).

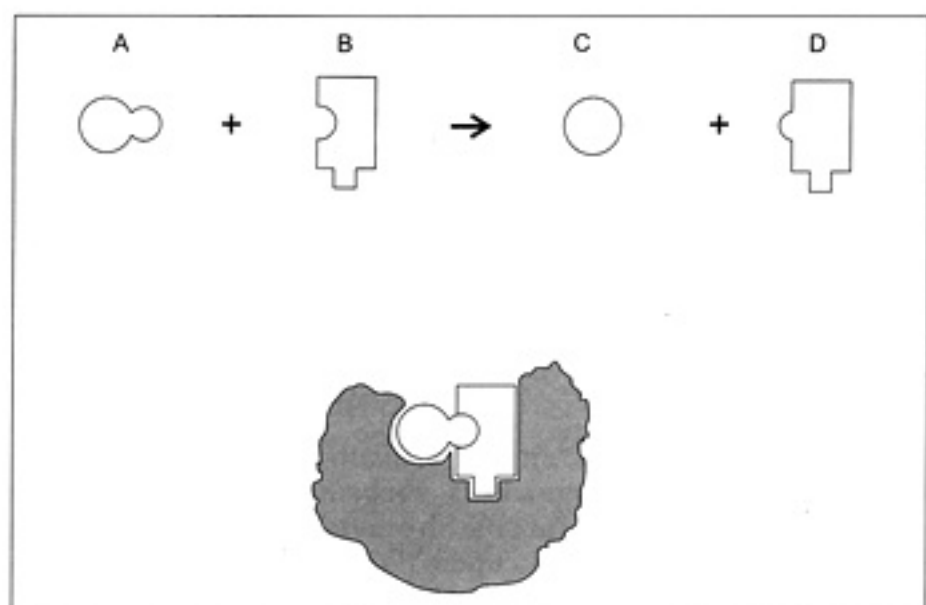


Figura 5.12 – Esquema de uma reação do tipo $A + B \rightarrow C + D$, que consiste na transferência de um grupo químico do composto A para o composto B. A reação depende da colisão entre as moléculas de A e B na posição favorável. Com a ligação dos substratos ao sítio ativo da enzima a reação é facilitada.

A relação espacial entre substrato e enzima não deve ser vista segundo um modelo rígido de chave-fechadura. A aproximação e a ligação do substrato à enzima altera o delicado balanço de forças responsáveis pela manutenção da estrutura tridimensional da enzima, amoldando sua forma à forma do substrato e fazendo-a adquirir uma nova conformação, ideal para a catálise. Assim como a enzima, os substratos têm sua conformação tensionada e distorcida, aproximando-se da conformação do estado de transição. Além disso, o substrato, corretamente posicionado no sítio ativo, está próximo de grupos R decisivos para a catálise. Retomando o exemplo mostrado na Fig. 5.3, o grupo positivo H^+ da catálise não-enzimática poderia ser substituído por um radical R positivo de um aminoácido do sítio ativo na catálise enzimática, passando, portanto, a reação a independe dos choques casuais entre as moléculas dos reagentes. É esse conjunto de mecanismos que torna a catálise enzimática tão eficiente.

5.4 – Inibição da atividade enzimática

A catálise enzimática pode ser impedida por compostos, que, quando presentes no meio, ligam-se diretamente à enzima, impedindo sua ação. Existem basicamente dois tipos de *inibidores*: competitivos e não-competitivos.

Os *inibidores competitivos* são substâncias que têm forma estrutural suficientemente semelhante à do substrato para poderem ligar-se ao sítio ativo da

enzima. Faltam-lhes, entretanto, grupos químicos que pudessem levar a reação a cabo; o resultado da sua presença no meio de reação é o estabelecimento de uma competição entre as moléculas do inibidor competitivo e as do substrato pela ligação com o sítio ativo da enzima (Fig. 5.13). Naturalmente, o percentual de inibição resultante dependerá de dois fatores: (1) as concentrações relativas de substrato e inibidor competitivo; (2) da afinidade diferencial da enzima pelo substrato e pelo inibidor. Por suas características, a inibição competitiva é bastante específica.

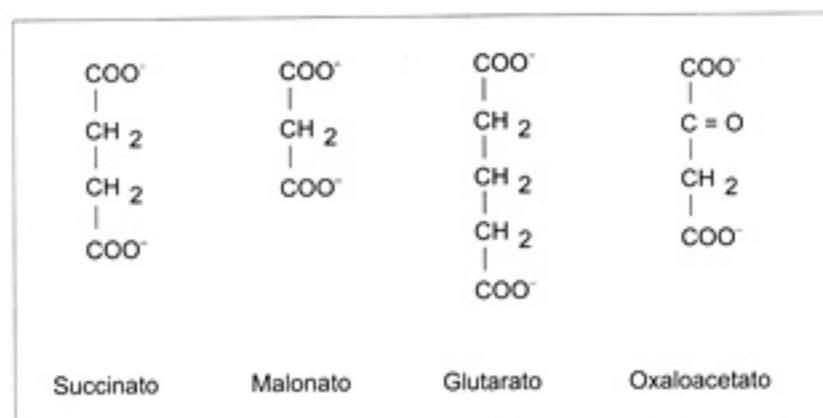


Figura 5.13 – Estrutura do substrato (succinato) e de três inibidores competitivos da succinato desidrogenase.

Os inibidores *não-competitivos* têm mecanismo de ação completamente diverso. Sua forma estrutural não guarda qualquer semelhança com a do substrato e a inibição é exercida pela sua capacidade de ligar-se a grupos R específicos, geralmente fora do sítio ativo. Essa ligação, altera a estrutura da enzima, impedindo a catálise. Por exemplo, íons de metais pesados, como Pb^{2+} e Hg^{2+} ligam-se facilmente a grupos -SH. Estes são grupos frequentes em proteínas (presentes nos grupos R de cisteína). A ação inibitória dos íons é, por isto, bastante inespecífica, incidindo sobre um grande número de enzimas, o que explica a toxidez destes íons metálicos, alvo atual de sérias preocupações ambientalistas.

Os inibidores competitivos, pela sua especificidade têm tido largo emprego terapêutico e constituem um instrumento potencialmente interessante no controle de vias metabólicas. A presença de inibidores não-competitivos nos organismos é, geralmente, acidental.

5.5 – Regulação da atividade enzimática

Os organismos podem regular a velocidade de uma reação catalisada enzimaticamente em dois níveis diferentes. Primariamente, a síntese da enzi-

ma é um processo controlado, respondendo às variações das condições do meio. Como a velocidade da reação catalisada é diretamente proporcional à concentração da enzima, uma maior velocidade de síntese privilegia a via metabólica da qual a enzima participa; o contrário também é verdadeiro. Esse nível de regulação está localizado no processo de transcrição do gene que codifica a enzima e é objeto de estudo da Biologia Molecular.

As enzimas já sintetizadas, porém, não têm uma atividade constante; e são tão sujeitas a um segundo nível de regulação. A modulação de sua atividade pode dar-se através de *regulação alostérica* ou *modificação covalente*.

5.5.1 – Regulação alostérica

Alguns compostos produzidos pelo metabolismo têm a propriedade de ligarem-se, com alta especificidade, a uma região de determinada enzima designada *sítio alostérico*, diferente do sítio ativo. Como é possível prever, a ligação de um composto qualquer modifica a estrutura terciária da enzima com dois resultados possíveis: a nova conformação pode auxiliar a catálise ou prejudicá-la. No primeiro caso, o composto é dito *efetuator alostérico positivo*; no segundo, *efetuator alostérico negativo*; a enzima que apresenta o sítio alostérico, e portanto pode receber o (ou os) efetuator alostérico (ou os efetutores alostéricos), é chamada *enzima alostérica* (Fig. 5.14).

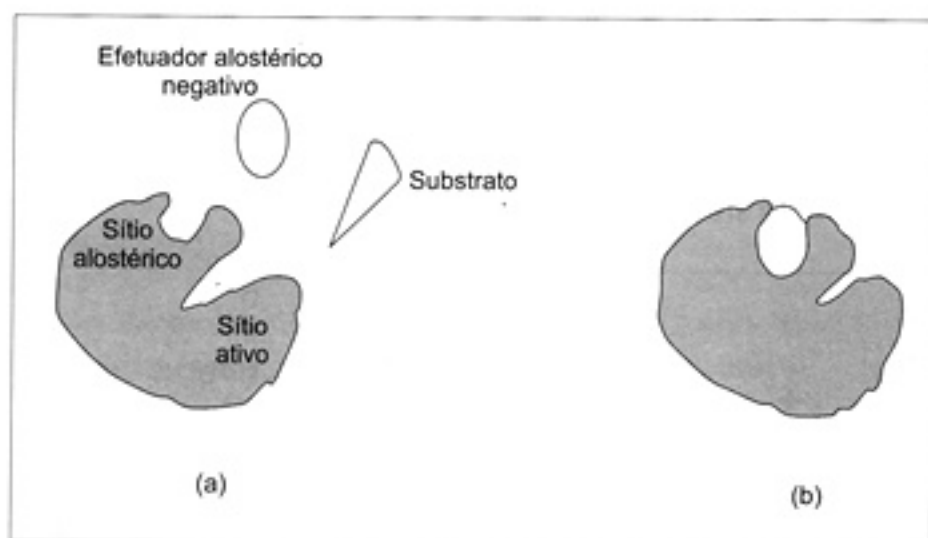


Figura 5.14 – Esquema de uma enzima alostérica. Nessa representação, a ligação do efetuator alostérico ao sítio alostérico altera a estrutura da enzima, dificultando a ligação do substrato ao centro ativo e, portanto, a catálise.

Esse recurso para a regulação da atividade enzimática é largamente empregado pelas células no controle de seu metabolismo. Praticamente todas as vias metabólicas contam com uma reação catalisada por uma enzima alostérica, sensível a algum dos produtos finais da via, que atua como efetuator alostérico negativo. A ligação do efetuator alostérico à enzima é reversível.

vel e, portanto, o percentual de enzima que se encontra ligada ao efetuator está na dependência da concentração deste. Quando o composto acumula-se em virtude do alto funcionamento da via, sua ligação à enzima alostérica acarreta diminuição da velocidade da reação por ela catalisada e a via é desacelerada. Se, a seguir, o efetuator alostérico é consumido por outra via, a diminuição de sua concentração provoca seu desligamento da enzima, que volta a funcionar com velocidade "normal". O processo constitui um mecanismo perfeito de *feedback*, impedindo o acúmulo de produtos desnecessários. O efeito alostérico é específico para um par efetuator alostérico-enzima. Assim, um determinado composto pode atuar como efetuator alostérico negativo sobre algumas enzimas e como efetuator alostérico positivo sobre outras, pertencentes a vias metabólicas diferentes. Quando a concentração celular do efetuator alostérico aumenta, algumas vias são inibidas mas, simultaneamente, outras vias são estimuladas, tornando harmônico o funcionamento celular.

5.5.2 – Modificação covalente

Algumas enzimas são submetidas a um processo de regulação que consiste na ligação covalente de um grupo químico à sua estrutura. Um exemplo freqüente é a transferência de um grupo fosfato, proveniente do ATP (ou seja, Adenosina Trifosfato, o principal composto de alta energia presente nos organismos) para a enzima-alvo (Fig. 5.15). Naturalmente, a presença do grupo fosfato acarreta a mudança da conformação espacial da enzima, outra vez com duas conseqüências possíveis: para algumas enzimas a nova conformação é cataliticamente inativa; para outras, só então forma-se um sítio ativo funcional. Assim, quando várias enzimas são simultaneamente fosforiladas, o metabolismo é drasticamente alterado, sendo acionadas vias que estavam inativas e inibidas vias até então funcionando.

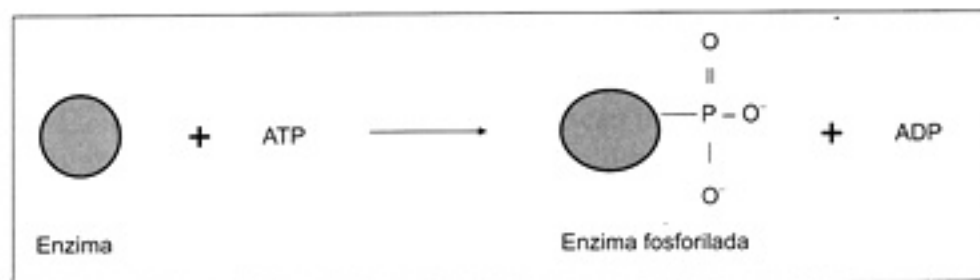


Figura 5.15 – Modificação covalente de uma enzima. A ligação do grupo fosfato, proveniente do ATP, muda a conformação da enzima, alterando sua atividade.

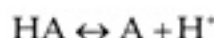
5.6 – Influência do meio sobre a atividade enzimática

A estrutura e a forma do sítio ativo são uma decorrência da estrutura tridimensional da enzima e podem ser afetadas por quaisquer agentes capazes de provocar mudanças conformacionais na estrutura protéica. Isso torna a ati-

vidade enzimática dependente do meio ambiente, notadamente do pH e temperatura.

5.6.1 – pH

A maioria das enzimas apresenta um valor de pH para o qual a sua atividade é máxima — a velocidade da reação diminui à medida que o pH se afasta desse valor ótimo, que é característico para cada enzima mas, com frequência, está próximo do pH neutro. A influência do pH sobre a catálise enzimática só pode ser compreendida a partir da análise dos grupos dissociáveis presentes nos grupos R dos aminoácidos. De fato, histidina, arginina, lisina, glutamato, aspartato, cisteína e tirosina (Fig. 5.4) têm grupos R que podem ser considerados ácidos fracos de Brönsted. Pela definição de Brönsted, ácidos são compostos capazes de dissociar-se, liberando H^+ . Ácidos fracos são aqueles em que a dissociação não é completa, restando em solução também uma porcentagem do ácido não dissociado; existe, portanto, um equilíbrio químico que pode ser escrito:



Como a equação acima sugere, as concentrações relativas de HA e de A dependem do pH. Quando o valor do pH é baixo (alta concentração de prótons), o equilíbrio rearranja-se pelo aumento da concentração de HA e diminuição da concentração de A. Quando o valor do pH é alto (baixa concentração de prótons), ocorre o inverso. Os grupos R dissociáveis dos aminoácidos comportam-se de maneira análoga, como está exemplificado na Fig. 5.16. Portanto, cada grupo apresenta-se ligado ou não ao próton, dependendo do pH.

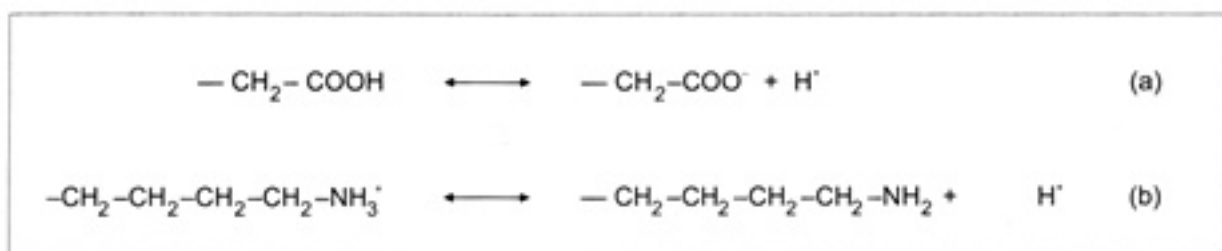


Figura 5.16 – Dissociação dos grupos R de aspartato (a) e de lisina (b).

A forma dos aminoácidos representada na Fig. 5.4 são as predominantes em $\text{pH} = 7$. Nesse valor de pH, alguns grupos R (como o grupo $-\text{COO}^-$ presente no glutamato e no aspartato) encontram-se dissociados e com carga elétrica. Outros (como o grupo $-\text{NH}_3^+$ da lisina) encontram-se associados ao próton mas também têm carga elétrica nesta situação. Uma enzima que se encontrasse em solução de pH igual a 7 apresentaria, portanto, os grupos R de seus aminoácidos na situação descrita e, portanto, aptos a formar ligações eletrostáticas importantes na estrutura terciária da molécula. Se o valor de pH da solução for diminuído, alguns grupos do tipo $-\text{COO}^-$ captam prótons, atendendo

ao aumento de sua concentração e à necessidade de reajustar o equilíbrio da dissociação. Convertem-se, assim, em $-\text{COOH}$, perdendo a carga elétrica. A ligação eletrostática da qual eventualmente participavam ($-\text{COO}^- - \text{NH}_3^+$) deixa de existir e a estrutura espacial da enzima é alterada. Analogamente, se o valor de pH for elevado, grupos do tipo $-\text{NH}_3^+$ serão dissociados, convertendo-se a $-\text{NH}_2$, perdendo também a carga elétrica; a ligação eletrostática da qual participavam será igualmente desfeita. Além de contribuírem para a manutenção da estrutura terciária da enzima, alguns desses grupos podem fazer parte do sítio ativo e para exercerem seu papel deverão apresentar carga elétrica.

Em resumo, a influência do pH sobre a catálise enzimática é exercida sobre os grupos dissociáveis de vários aminoácidos. Alguns desses grupos podem fazer parte do sítio ativo ou serem importantes na manutenção da estrutura espacial da molécula. A cada valor de pH, alguns desses grupos apresentam-se protonados ou desprotonados. Existe uma concentração hidrogeniônica que propicia um determinado arranjo de grupos protonados e desprotonados, que leva a molécula de enzima à conformação ideal para exercer seu papel catalítico. Esse *pH ótimo* depende, portanto, do número e tipo de grupos ionizáveis que uma enzima apresenta, ou seja, depende de sua estrutura primária. Por outro lado, quando o substrato contém grupos ionizáveis, as variações de pH também poderão afetar sua carga. A eficiência da catálise dependerá, então, de encontrarem-se, enzima e substrato, com conformação e carga adequadas para permitir sua interação.

5.6.2 – Temperatura

A influência da temperatura sobre a cinética da reação enzimática deve ser entendida em duas fases distintas: em princípio, aumentos de temperatura levam a aumentos de velocidade de reação, por aumentar a energia cinética das moléculas componentes do sistema, aumentando a probabilidade de choques efetivos entre elas. Esse efeito é observado em um intervalo de temperatura compatível com a manutenção da estrutura espacial da enzima. Temperaturas mais altas levam à *desnaturação* da enzima, ou seja, à perda de sua estrutura nativa, catalítica, por alterarem as ligações químicas que mantêm sua estrutura tridimensional. Rompidas as pontes de hidrogênio, que são ligações bastante termolábeis, desencadeia-se uma cascata de alterações estruturais, levando a enzima a uma nova conformação ou a um estado sem estrutura definida; a enzima é dita, então, *desnaturada*. A temperatura que provoca desnaturação naturalmente varia para cada enzima mas, geralmente, está pouco acima de sua temperatura ótima.

5.6.3 – Desnaturação

A *desnaturação protéica* é entendida como a perda da estrutura que propicia a função da proteína. Habitualmente, os agentes desnaturantes preser-

vam apenas as ligações covalentes da estrutura protéica, ou seja, as ligações peptídicas (da estrutura primária) e as pontes dissulfeto (da estrutura terciária). Não só temperaturas elevadas levam à desnaturação. Outras variáveis do meio que afetam as ligações químicas têm o mesmo efeito. Assim, *valores extremos de pH*, provocando protonação ou desprotonação de grupos, ocasionam perda da atividade da enzima. Os *detergentes* contêm porções hidrofóbicas em suas moléculas e sua presença em solução interfere fortemente nas interações hidrofóbicas entre os grupos R, importantes na manutenção da estrutura protéica. *Solventes apolares*, mudando a constante dielétrica do meio, alteram a força das ligações eletrostáticas, provocando desnaturação. Na maior parte dos casos, a desnaturação é um processo irreversível.

5.7 – Co-fatores e coenzimas

Muitas enzimas necessitam da associação com outras moléculas ou íons para exercer seu papel catalítico. Esses componentes da reação enzimática são genericamente chamados co-fatores. Os co-fatores podem ser *íons metálicos* ou moléculas orgânicas, não protéicas, de complexidade variada, que recebem o nome de *coenzimas*.

Os íons metálicos ligam-se a grupos R de aminoácidos da cadeia protéica ou estão presentes em grupos prostéticos. Cumprem papel decisivo na catálise, participando efetivamente da reação química. Algumas enzimas aceitam vários íons metálicos bivalentes como ativadores, como Ca^{2+} , Mg^{2+} ou Mn^{2+} , enquanto outras exigem um íon específico para a catálise. Esse íon pode ser de Fe, Cu, Ni, Co, Zn, Se ou de outros metais.

As coenzimas atuam como aceptores de átomos ou grupos funcionais retirados do substrato em uma dada reação e como doadores destes mesmos grupos ao participarem de uma outra reação e, por isto, diz-se que as coenzimas são transportadoras de determinados grupos (Quadro 5.1). Durante a catálise, coenzima e substrato acham-se alojados no centro ativo da enzima, consistindo a reação na remoção de determinado grupo químico do substrato e sua transferência para a coenzima, ou vice-versa. Vê-se, portanto, que as coenzimas não apenas sofrem modificações em sua estrutura ao participar de uma reação enzimática, mas são necessárias em quantidades estequiométricas em relação ao substrato. Todavia, o fato de as coenzimas estarem sendo constantemente recicladas, oscilando entre apenas duas formas, permite que suas concentrações celulares possam ser bastante reduzidas, muito menores do que as concentrações de substrato.

Quadro 5.1 – Coenzimas e grupos aos quais se ligam ou desligam em diferentes reações.

COENZIMA	GRUPO TRANSPORTADO
Adenosina trifosfato (ATP)	Fosfato
Biotina	CO ₂
Coenzima A	Acila
Flavina adenina dinucleotídeo (FAD)	Hidrogênio
Tetraidrofolato	Carbono
Nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD ⁺)	Hidreto
Tiamina pirofosfato (TPP)	Aldeído

Nem sempre é imediata a diferença entre substrato e coenzima. No entanto, um critério diferencial é o fato de o substrato sofrer novas alterações nas reações metabólicas subseqüentes, enquanto a coenzima, através de outra reação, volta à sua forma original. A reação que modifica a coenzima e a reação que restaura sua forma original são catalisadas por enzimas diferentes e específicas, que têm em comum apenas o fato de utilizarem a mesma coenzima. Além disso, na maior parte das reações, a ligação da coenzima à enzima precede a ligação do substrato à enzima.

Em alguns casos, a coenzima encontra-se covalentemente ligada à molécula enzimática, constituindo, portanto, um grupo prostético da proteína; em outros casos, a coenzima é uma molécula “livre”, reunindo-se à enzima apenas no momento da catálise. Duas coenzimas transportadoras de hidrogênio podem servir como exemplo das duas possibilidades: a flavina adenina dinucleotídeo (FAD) aparece sempre como grupo prostético de enzimas, enquanto a nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD⁺) é geralmente livre, podendo atuar como coenzima de diversas enzimas (Figs. 5.17 e 5.18).

A estrutura química das coenzimas é bastante variável. Algumas coenzimas, como o ATP e o GTP (guanosina trifosfato), são integralmente sintetizadas pelas células. Outras apresentam em sua molécula um componente orgânico que não pode ser sintetizado pelos animais superiores. Esse componente, ou um precursor imediato, deve então ser obtido através da dieta, constituindo uma *vitamina*. As vitaminas são, portanto, compostos orgânicos indispensáveis ao crescimento e funções normais dos animais superiores e que, ao contrário de carboidratos, proteínas e lipídios, são requeridos na dieta em pequenas quantidades (microgramas ou miligramas diários), já que são precursores de coenzimas, cujas concentrações celulares são muito pequenas. Na Microbiologia as vitaminas incluem-se entre os compostos que, genericamente, são chamados

fatores de crescimento, assinalando a necessidade de sua presença no meio de cultura para o desenvolvimento do microrganismo. A necessidade desses compostos varia com a espécie. *Escherichia coli*, uma bactéria comum no trato intestinal humano, é capaz de multiplicar-se em uma solução contendo apenas uma fonte de carbono (glicose, por exemplo), uma fonte de nitrogênio (NH_4^+ , por exemplo) e alguns sais minerais; é, portanto, capaz de sintetizar todos os compostos necessários à sua manutenção e reprodução, inclusive aqueles que, para os animais superiores, constituem vitaminas. Outras espécies bacterianas necessitam vitaminas, aminoácidos, bases nitrogenadas, etc.

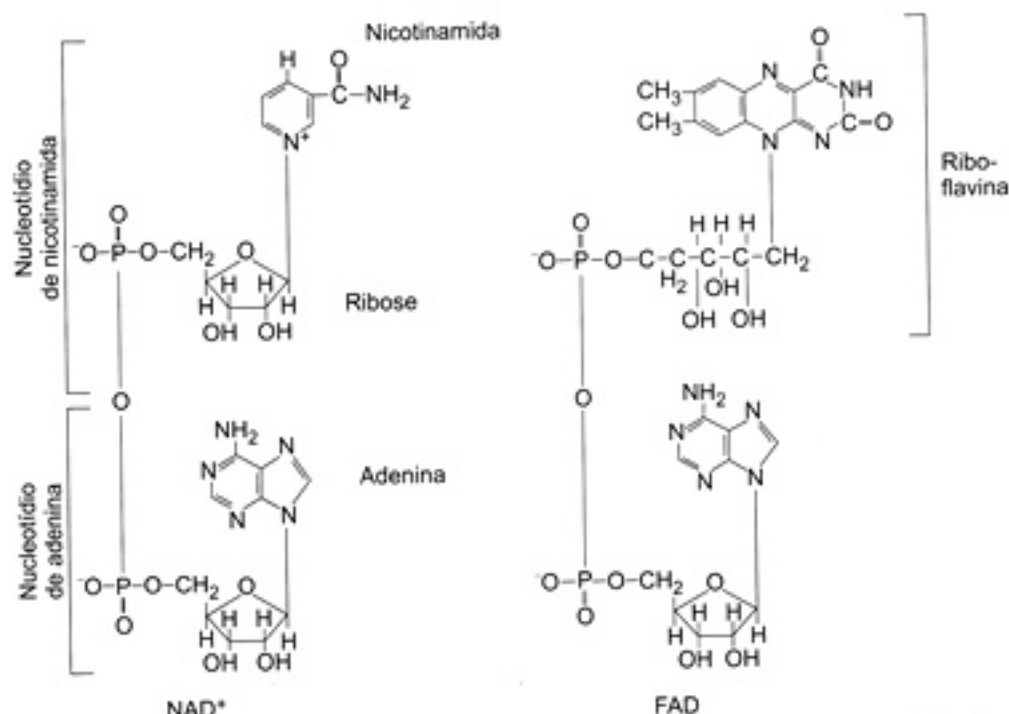


Figura 5.17 – Estrutura de duas coenzimas, a nicotinamida adenina dinucleotídio (NAD⁺) e flavina adenina dinucleotídio (FAD). Cada nucleotídio é formado por uma base nitrogenada, uma ribose e um grupo fosfato.

As vitaminas são classicamente divididas em hidrossolúveis e lipossolúveis. São hidrossolúveis: tiamina (vitamina B₁), riboflavina (B₂), ácido pantotênico (B₃), nicotinamida (B₆), piridoxina (B₆), biotina (B₇), ácido fólico (B₉), cobalamina (B₁₂) e ácido ascórbico (C). As vitaminas A, D, E e K são lipossolúveis. As vitaminas hidrossolúveis são as que têm função de coenzimas ou fazem parte de moléculas de coenzimas. A participação das vitaminas lipossolúveis nas reações metabólicas é muito menos conhecida.

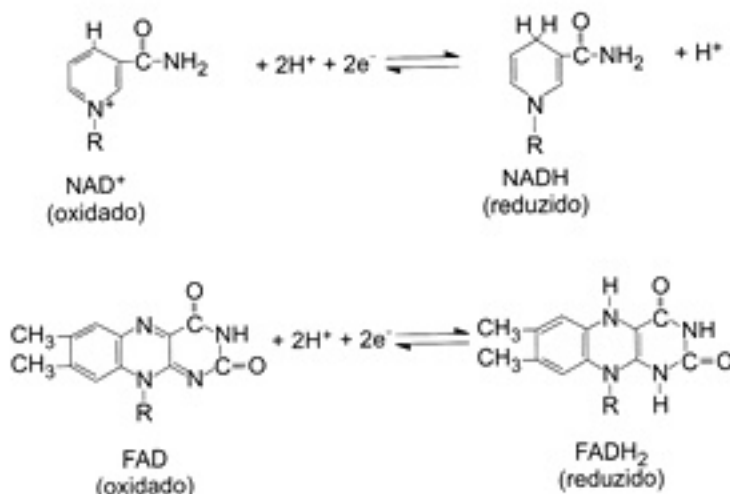
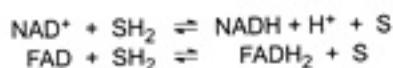


Figura 5.18 – Reações de oxidorredução catalisadas por enzimas que têm NAD⁺ ou FAD como coenzimas: o substrato reduzido (SH₂) é oxidado, perdendo dois átomos de hidrogênio e as coenzimas tornam-se reduzidas. O NAD⁺ recebe dois elétrons e um próton, ficando o segundo próton no meio. O FAD recebe os dois átomos de hidrogênio. Estão representadas apenas as partes reativas das coenzimas; o restante da molécula está representado por R.

5.8 – Medida da atividade enzimática

As medidas de concentração de soluções, expressas em unidades de massa por unidades de volume, de uso corrente na Química, não têm aplicação para soluções enzimáticas, já que para estas o que importa não é a massa, mas a atividade. Uma solução de enzimas desnaturadas conserva a massa protéica mas a propriedade catalítica está perdida. Desnaturações parciais podem levar duas soluções de mesma concentração enzimática a ter atividades muito diferentes.

Em virtude do exposto, a dosagem de enzimas é sempre feita através da medida de sua *atividade*, que é avaliada pela velocidade da reação que a enzima catalisa. Dada a especificidade das enzimas, essa medida é possível, mesmo na presença de outras proteínas. Para efetuar essas dosagens, uma amostra da solução contendo a enzima é incubada com concentrações altas de substratos (para garantir a velocidade máxima e impedir que pequenas variações na concentração do substrato possam afetar as medidas). A velocidade da reação é medida e expressa em Unidades Internacionais. Uma *Unidade Internacional* (U) é a quantidade de enzima capaz de formar 1 μmol de produto por minuto em condições ótimas de medida (pH, temperatura etc.), especificadas para cada caso.

A medida da atividade enzimática é imprescindível para monitorar a purificação de uma enzima. Quando se pretende purificar uma enzima, inicia-se o processo de isolamento a partir de um macerado de células, órgão ou tecido, o *extrato celular*. Tomando uma amostra desse extrato, deve-se determinar a atividade da enzima de interesse (em U/mL, geralmente) e a quantidade total de Unidades presentes no volume total do extrato. Para adotar um parâmetro que permita a comparação com outras preparações e com etapas posteriores do processo de purificação, é necessário usar um referencial; a referência habitualmente utilizada é a concentração total de proteína presente na preparação. Define-se, assim, a *atividade específica*, ou seja, o número de Unidades de enzima por miligrama de proteína. Processada a primeira etapa em direção à purificação da enzima, são feitas novas medidas de atividade e de concentração de proteína, e calculada a nova atividade específica. Se a etapa de purificação foi bem sucedida, a atividade específica encontrada deve aumentar. Esse aumento significa, naturalmente, que o procedimento adotado eliminou proteínas indesejáveis. Novos processos de purificação são efetuados até que, no caso ideal, a atividade específica da preparação torna-se máxima e constante, indicando que a enzima está pura.

5.9 – Classificação e nomenclatura

Pelas regras oficiais de classificação e nomenclatura, as enzimas são divididas em seis grupos, de acordo com o tipo de reação que catalisam (Quadro 5.2). Cada um desses grupos é ainda subdividido em classes e subclasses, numeradas de tal forma que cada enzima possa ser identificada sem ambigüidade. Assim, por exemplo, a enzima que catalisa a remoção de elétrons do etanol (portanto, uma oxidorreductase) é designada *álcool:NAD⁺:oxidorreductase* e recebe o número de classificação EC 1.1.1.1. (EC, de Enzyme Commission). Essa nomenclatura oficial é, na prática, muitas vezes desobedecida, em favor de nomes mais simples ou que se tornaram clássicos. Assim, por exemplo, a enzima citada que catalisa a oxidação do etanol é comumente referida como *álcool desidrogenase*; a enzima que catalisa a síntese de glicogênio (oficialmente designada *UDPglicose:glicogênio 4- α -D-glicosiltransferase*) é chamada *glicogênio sintase*. Como se vê nesses exemplos, na nomenclatura usual, o nome é dado indicando o substrato, seguido de uma outra palavra terminada em ase que especifica o tipo de reação que a enzima catalisa. Mesmo essa forma simplificada de nomenclatura apresenta exceções, como é o caso das enzimas digestivas: *pepsina*, *tripsina* etc, cujos nomes triviais tornaram-se clássicos antes que as regras sistemáticas de classificação e nomenclatura fossem estabelecidas. Apesar disso, não é necessário memorizar os nomes das enzimas pois, com um pouco de prática, é possível prever o nome da enzima conhecendo-se a reação que ela catalisa, ou vice-versa.

Quadro 5.2 – Classificação das enzimas segundo a Enzyme Commission

CLASSE	TIPO DE REAÇÃO
	Oxidorredução
1 – Oxidorredutases	$A^- + B \leftrightarrow A + B^-$
	Transferência de grupos
2 – Transferases	$A-X + B \leftrightarrow A + B-X$
	Hidrólise
3 – Hidrolases	$A-B + H_2O \leftrightarrow A-H + B-OH$
	Adição de grupos a duplas ligações ou remoção de grupos, deixando dupla ligação
4 – Liases	$\begin{array}{c} X & Y \\ & \\ A-B \end{array} \leftrightarrow A=B + X-Y$
	Rearranjos intramoleculares
5 – Isomerases	$\begin{array}{c} X & Y \\ & \\ A-B \end{array} \leftrightarrow \begin{array}{c} Y & X \\ & \\ A-B \end{array}$
	Condensação de duas moléculas, associada à hidrólise de uma ligação de alta energia (em geral, do ATP)
6 – Ligases	$A + B \leftrightarrow A-B$

Leituras complementares

MARZZOCO, A.; TORRES, B.B. **Bioquímica Básica**. 2ª edição Rio de Janeiro, Guanabara, 1999.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Principles of Biochemistry**. New York, Worth Publishers, 1995.

STRYER, L. **Biochemistry**. 4.ª ed. New York, W.H. Freeman and Company, 1995.

VOET, D.; VOET, J.G. **Biochemistry**. 2.ª ed. New York, John Wiley & Sons, 1995.

HORTON, H.R.; MORAN L.A.; OCHS R.S.; RAWN J.D.; SCRIMGEOUR K.G. **Principles of Biochemistry**. Englewood Cliffs, NJ, Neil Patterson Publishers-Prentice Hall, 1993.

ZUBAY, G.L.; PARSON, W.W.; VANCE, D.E. **Principles of Biochemistry**. Dubuque, Wm. C. Brown Communications, Inc., 1995.

GARRET, R.H.; GRISHAM, C.M. **Biochemistry**. Fort Worth, Saunders College Publishing, 1995.

RITTER, P. **Biochemistry-A Foundation**. Pacific Grove, California, Brooks/Cole Publishing Company, 1996.

6

CAMINHOS METABÓLICOS

Otto Jesu Crocomo e Luiz Eduardo Gutierrez

6.1 – Introdução

Todas as reações químicas que acontecem no contexto da célula e, portanto, são reações bioquímicas, são importantes para o aparecimento e continuação da vida sobre a Terra; mas há algumas que historicamente apresentam maior importância. É o caso das reações da fermentação de carboidratos, mais especificamente de hexoses, que Gay Lussac em 1815 representou pela seguinte equação geral:



Na realidade, a reação bioquímica representada por essa equação engloba uma série de reações intermediárias elucidadas, graças à descoberta pelos irmãos Büchner nos finais do século passado em células de levedura, de enzimas que seriam responsáveis pelo processo fermentativo, e aos exaustivos trabalhos de Parnas, Embden, os Cori, Lori, Meyerhoff, Warburg e muitos outros pesquisadores, na primeira metade deste século. A degradação de glicose nos músculos dos animais e a fermentação alcoólica em leveduras são semelhantes, o que facilitou a visualização das reações. A bioquímica comparada auxiliou grandemente o avanço dos conhecimentos nessa área. Esses resultados foram corroborados com o uso de técnicas isotópicas em levedura por KOSHLAND, WESTHEIMER⁽¹⁾ fazendo com que se estabelecesse definitivamente a seqüência de reações bioquímicas que recebe o nome de glicólise, ou seja, a molécula de hexose (representada pela glicose) é cindida (*lisis*) em um determinado momento na série de reações. Inicialmente há formação de açúcar fosforilado, seguindo-se seu desdobramento até triosefosfato, o qual sofre oxidação produzindo finalmente piruvato, produto final da glicólise.

6.2 – Processos de obtenção de energia

6.2.1 – Glicólise ou via de Embden-Parnas-Meyerhof

O caminho metabólico da glicólise envolve várias fases:

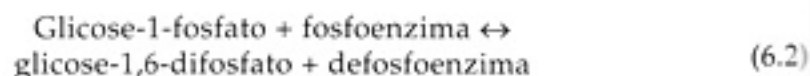
1.ª fase – Fosforilação do açúcar

No final do século passado os trabalhos de Cremer apontaram para o fato de que extratos de levedura contendo 10% ou mais de açúcares fermentescíveis eram capazes de sintetizar glicogênio. Observou-se posteriormente que o glicogênio era metabolizado em levedura, através de processos de fosforilação e que o produto era uma mistura de glicose e frutose-6-fosfato. Nos finais da década de 30, o grupo de Cori demonstrou que extratos de músculos dializados degradavam glicogênio a glicose-1-fosfato (chamada éster de Cremer-Cori), pela ação de uma fosforilase, que existe em células de levedura. Observe-se que, embora essa enzima seja detectada em levedura, o glicogênio não pode agir como única fonte de carbono *in vivo* uma vez que essas células não produzem as amilases necessárias para a sua degradação.

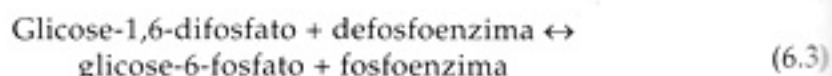
A glicose-1-fosfato é convertida em glicose-6-fosfato (éster de Robinson) pela enzima fosfoglicomutase, que é encontrada em células de levedura. Íons manganês, magnésio ou cobalto são exigidos como fatores para a ação dessa enzima, que catalisa a transferência do grupo fosfato do C-1 para o C-6 da molécula de glicose. Essa complexa reação foi elucidada pelo grupo de Leloir, na Argentina, evidenciando a glicose-1,6-difosfato como coenzima. Utilizando compostos marcados com ^{32}P , os pesquisadores observaram uma troca entre o grupo fosfato marcado na enzima (fosfoglutamutase) e glicose-1-fosfato, o que permitiu resolver não somente o modo de transferência do grupo fosfato mas também o envolvimento de glicose-1,6-difosfato na reação.

A enzima age sob duas formas, uma fosforilada (fosfoenzima) e uma não fosforilada (defosfoenzimã):

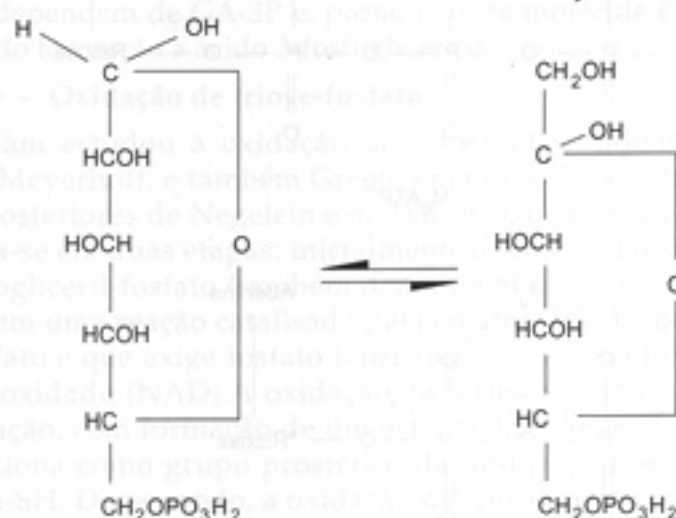
A) A fosfoenzima transfere o grupo fosfato para a molécula de glicose-1-fosfato, produzindo-se glicose-1,6-difosfato:



B) A defosfoenzima reage com glicose-1,6-difosfato:



Segue-se, então a isomerização de glicose-6-fosfato em frutose-6-fosfato (éster de Neuberg), catalisada pela enzima **fosfohexoseisomerase** (Fig. 6.1).



Glicose-6-P

Frutose-6-P
(éster de Neuberg)

Figura 6.1 – Isomerização entre glicose-6-fosfato e frutose-6-fosfato

A formação dessas duas fosfohexoses pode dar-se também pela transferência de fosfato da molécula de adenosina trifosfato (ATP) para a molécula de glicose ou de frutose, pela ação de hexoquinase, em presença de íons magnésio:



O equilíbrio da reação desloca-se no sentido da formação dos ésteres fosforilados, entretanto experimentos com glicose-6-fosfato- ^{14}C e glicose- ^{14}C indicam que ela é reversível.

Hexoquinase exige Mg^{2+} porque um dos componentes (ATP) da reação não está sob a forma de ATP^+ e sim na do complexo MgATP^+ (Fig. 6.2).

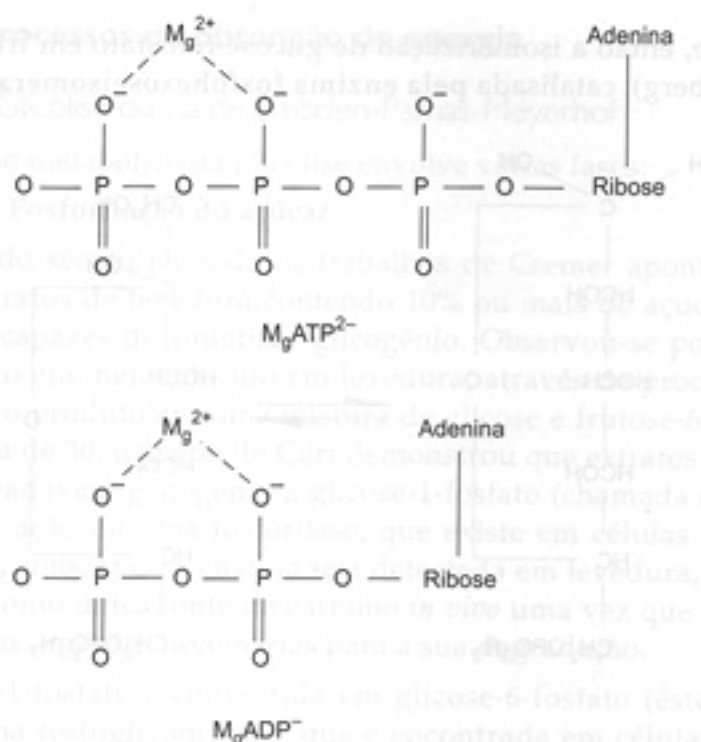
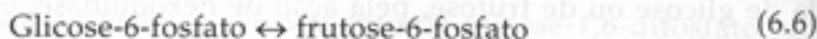
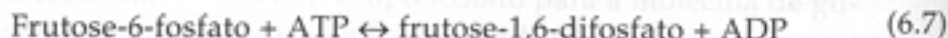


Figura 6.2 – Complexo Mg.ATP

Por outro lado, glicose-6-fosfato sofre isomerização produzindo frutose-6-fosfato pela ação da enzima fosfoglicomutase. Essa reação envolve a migração do oxigênio carbonílico do C-1 para o C-2, exige também íons magnésio e é prontamente reversível.

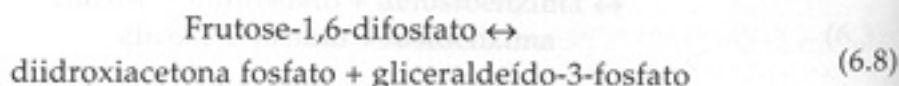


Uma vez formada, frutose-6-fosfato converte-se em frutose-1,6-difosfato (éster de Harden-Young), em presença de ATP e íons magnésio, em uma reação catalizada pela enzima fosfofrutoquinase.



2.ª fase – Desdobramento do açúcar fosforilado

Graças à ação de frutose difosfato aldolase, ou simplesmente aldolase, a frutose-1,6-difosfato é cindida em duas moléculas de triosefosfato: fosfodihidroxiacetona (PDHA) e gliceraldeído-3-fosfato (GA-3P). Tão logo são formadas, essas duas triosefosfatos entram em equilíbrio entre si, em presença de fosfotrioseisomerase.



Essa reação é a cisão da molécula original de hexose que foi fosforilada nos C-1 e 6, e então clivada para formar as 2 moléculas de triosefosfato, as quais na realidade são moléculas de gliceraldeído-3-fosfato, uma vez que as reações posteriores dependem de GA-3P e, portanto, esta molécula é que será desassimilada, dando formação a ácido 3-fosfoglicérico.

3.ª fase – Oxidação de triose-fosfato

Needham estudou a oxidação de 3-fosfogliceraldeído em células de músculos e Meyerhoff, e também Green, em músculos e células de levedura. Trabalhos posteriores de Negelein e de Warburg demonstraram que a oxidação processa-se em duas etapas: inicialmente a molécula de GA-3P dá formação a 3-fosfogliceril-fosfato (também denominado ácido 1,3-difosfoglicérico: 1,3-DPGA) em uma reação catalisada pela enzima desidrogenase de gliceraldeído-3-fosfato e que exige fosfato inorgânico e dinucleótido de nicotinamida-adenina oxidado (NAD). A oxidação da forma aldeídica é precedida pela sua fosforilação, com formação de um éster tiólico como intermediário. Glutathione funciona como grupo prostético da desidrogenase de GA-3P, que é uma enzima-SH. Desse modo, a oxidação de triosefosfato pode ser visualizada na Fig. 6.3.

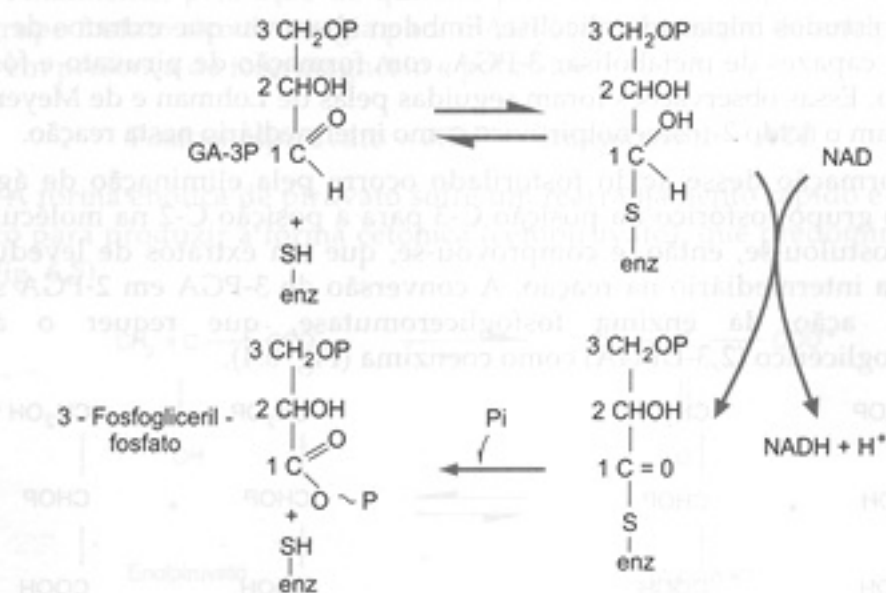


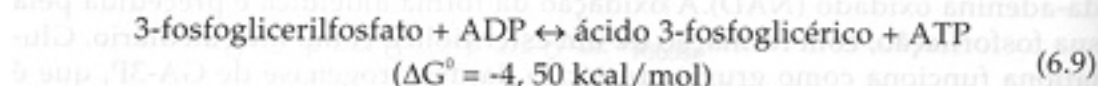
Figura 6.3 – Oxidação de triosefosfato

Essa é uma das reações glicolíticas onde ocorre conservação de energia a qual, posteriormente, aparecerá sob a forma de ATP. Observe-se que durante a reação o grupo aldeído de GA-3P sofre desidrogenação, produzindo um anidrido carboxílico com o ácido fosfórico (Pi = fosfato inorgânico). Esse anidrido é o 3-fosfogliceril-fosfato que é um acil fosfato com alta energia livre de hidrólise padrão ($\Delta G^\circ = -11,8 \text{ kcal/mol}$) localizada no C-1 de sua molécula. A li-

gação fosfórica do C-3 é de baixa energia livre de hidrólise padrão, cerca de 3,2 kcal/mol.

A enzima gliceraldeído fosfato desidrogenase tem peso molecular igual a 140.000 e contém 4 subunidades idênticas, cada uma consistindo de uma cadeia polipeptídica simples, com aproximadamente 330 resíduos de aminoácidos. A enzima é inibida por iodoacetato, que se combina com os grupos -SH essenciais da enzima, inibindo-a. A descoberta dessa inibição é um dos mais importantes marcos na história da elucidação dos passos metabólicos comprometidos na glicólise e no processo fermentativo.

Na segunda etapa, a enzima fosfogliceroquinase, na presença de íons magnésio, catalisa a transferência do grupo acilfosfato rico de energia para o ADP, recuperando a energia sob a forma de ATP. Ao mesmo tempo forma-se o ácido 3-fosfoglicérico (3-PGA):



Essa reação mais a que a precede, constituem um processo de acoplamento bioquímico de energia.

Nos estudos iniciais da glicólise, Embden observou que extratos de músculo eram capazes de metabolizar 3-PGA, com formação de piruvato e fósforo inorgânico. Essas observações foram seguidas pelas de Lohman e de Meyerhoff, que isolaram o ácido 2-fosfoenolpirúvico como intermediário nesta reação.

A formação desse ácido fosforilado ocorre pela eliminação de água e desvio do grupo fosfórico da posição C-3 para a posição C-2 na molécula de 3-PGA. Postulou-se, então, e comprovou-se, que em extratos de levedura o 2-PGA era intermediário na reação. A conversão de 3-PGA em 2-PGA se dá graças à ação da enzima fosfogliceromutase, que requer o ácido 2,3-difosfoglicérico (2,3-DPGA) como coenzima (Fig. 6.4).

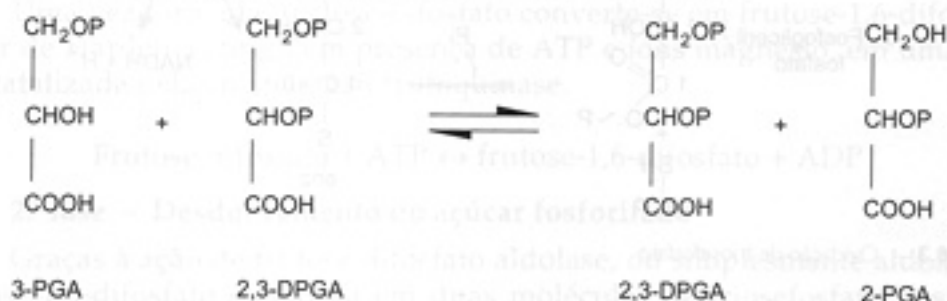
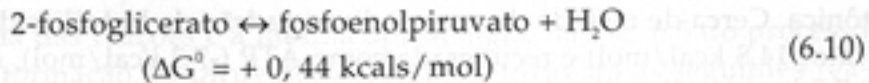


Figura 6.4 – Esquema da conversão de 3-PGA em 2-PGA

4.ª fase – Formação de piruvato

A formação do produto final da glicólise, piruvato, é precedida pela remoção de uma molécula de água de 2-PGA, catalisada por enolase, produzindo

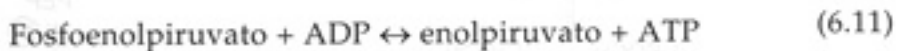
do fosfoenolpiruvato (PEP) em presença de íons magnésio, em uma reação com geração de composto fosfatado rico de energia:



A energia livre de hidrólise padrão de PEP é de cerca de -14,8 kcal, enquanto que a de 2-PGA é de cerca de -4,2 kcal. A perda da molécula de água de 2-PGA determina uma redistribuição de energia dentro da molécula, criando uma molécula com alta energia livre, que é liberada quando o grupo fosfato de PEP é posteriormente hidrolisado.

A enzima enolase possui peso molecular igual a 85.000 e exige íons magnésio, que formam um complexo com a enzima antes da união com o substrato. A enzima é inibida por íons fluoreto e fosfato; na realidade o íon fluorfosfato une-se ao magnésio, formando o verdadeiro agente inibidor. Entretanto, íons manganês podem substituir os íons magnésio como co-fatores da enzima, e nesse caso não ocorre a inibição.

Finalmente, pela ação de quinase pirúvica, fosfoenolpiruvato transfere seu grupo fosfato rico de energia para o ADP, com formação de enolpiruvato e ATP, em presença de íons magnésio e potássio:

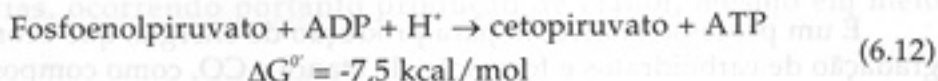


A forma enólica de piruvato sofre um rearranjo rápido e não enzimático para produzir a forma cetônica (cetopiruvato), que predomina em pH 7,0 (Fig. 6.5).



Figura 6.5 – Rearranjo não enzimático entre as formas enólica e cetônica de piruvato

O equilíbrio dessa reação desloca-se para a direita e, por ação de massa, a reação de quinase pirúvica é direcionada para a formação de cetopiruvato, dando uma reação global assim representada:



A reação processa-se em presença de íons potássio e magnésio ou manganês. O elevado valor da energia livre padrão dessa reação é devido, em parte, ao fato da conversão espontânea da forma enólica do piruvato para a forma cetônica. Cerca de metade da energia livre padrão de hidrólise do fosfoenolpiruvato (-14,8 kcal/mol) é recuperada como ATP (-7,3 kcal/mol), sendo o restante (-7,5 kcal/mol) utilizado para direcionar a reação para a direita, uma vez que em condições fisiológicas esta reação é essencialmente irreversível.

A seqüência geral das reações bioquímicas envolvidas no processo glicolítico, e apresentadas acima, está visualizada na Fig. 6.6.

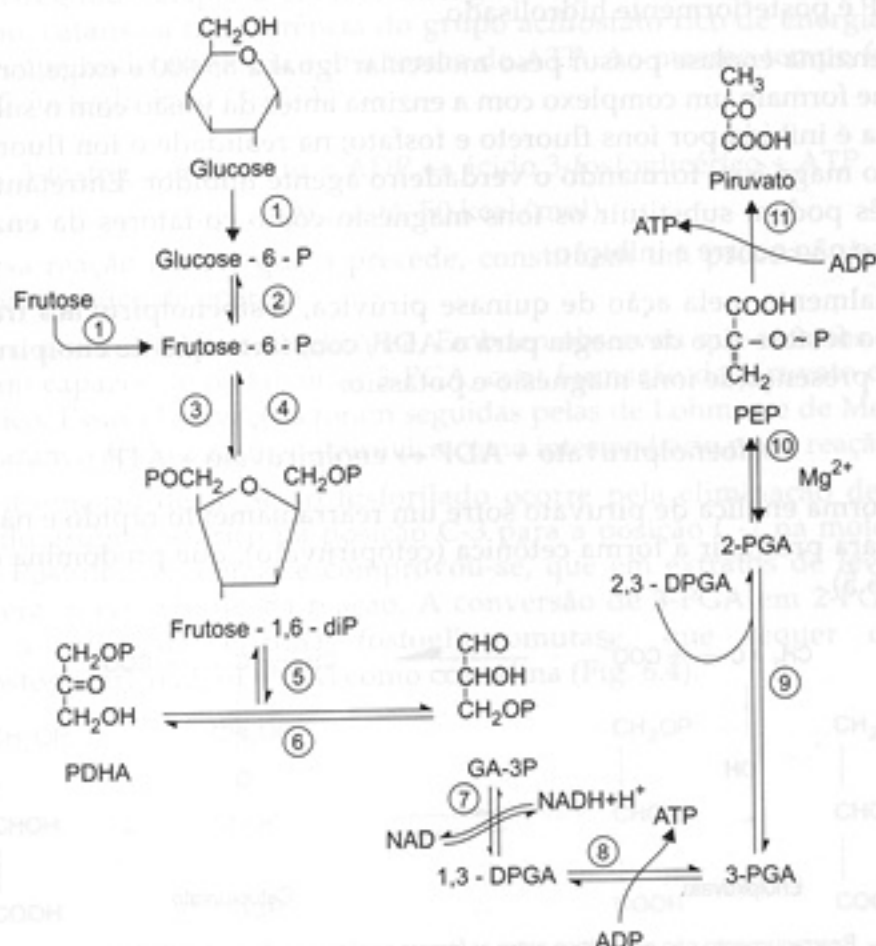


Figura 6.6 – Esquema glicolítico. Enzimas: 1) hexoquinase; 2) fosfohexoseisomerase; 3) fosfofrutoquinase; 4) fosfatase; 5) aldolase; 6) fosfoglicoseisomerase; 7) desidrogenase de triosefosfato; 8) fosfoglicerocinase; 9) fosfogliceromutase; 10) enolase; 11) quinase pirúvica.

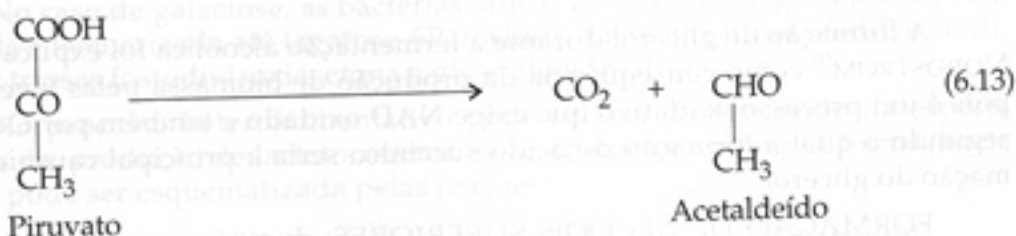
6.2.2 – Fermentação alcoólica

É um processo anaeróbico para produção de energia, que ocorre com degradação de carboidratos e formação de etanol e CO₂ como compostos princi-

pais e, como subprodutos glicerol, ácidos pirúvico e succínico e álcoois superiores. É realizada por leveduras, principalmente do gênero *Saccharomyces* e bactérias como a *Zymomonas mobilis*.

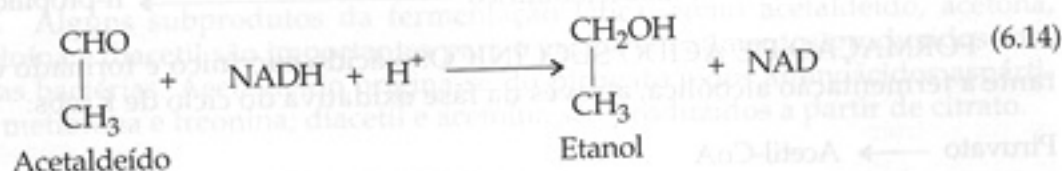
A seqüência das reações é a mesma apresentada na Fig. 6.6 do processo glicolítico até a formação do piruvato. A partir de piruvato as seguintes reações ocorrem:

Ação da descarboxilase pirúvica



A descarboxilase pirúvica exige pirofosfato de tiamina (TPP) como co-fator e a atividade é prejudicada pela presença de sulfito, pois este destrói TPP. A enzima não é altamente específica atuando sobre outros cetoácidos.

Ação da desidrogenas alcoólica

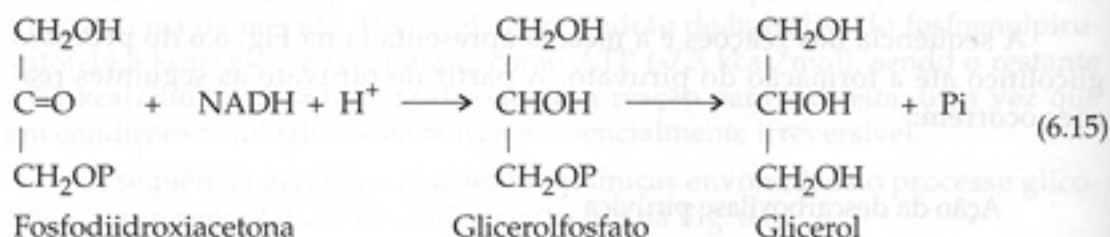


A enzima é inibida por sulfito, porque o acetaldeído forma um composto de adição com o ânion HSO_3^- .

EFEITO PASTEUR: em meio anaeróbio ocorre decréscimo na produção de etanol e redução do consumo de açúcar. A explicação mais aceita é dada pela atividade da fosfofrutoquinase, enzima alostérica da glicólise, que é inibida por ATP e citrato (presentes em maior quantidade no meio aeróbio) e ativada por AMP, ADP e fosfato inorgânico.

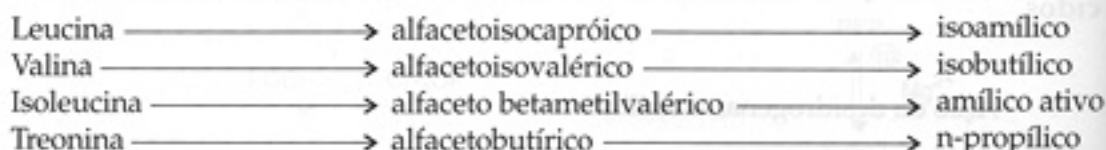
EFEITO CRABTREE: para algumas leveduras, altas concentrações de açúcares inibem a atividade de enzimas respiratórias e a formação de mitocôndrias, ocorrendo portanto produção de etanol, mesmo em meio aeróbio.

FORMAÇÃO DE GLICEROL: durante a fermentação alcoólica cerca de 5% do açúcar consumido pode ser convertido em glicerol a partir de um desvio da fosfodiidroxiacetona da glicólise:

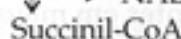
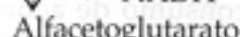


A formação de glicerol durante a fermentação alcoólica foi explicada por NORDSTROM⁽²⁾ como consequência da produção de biomassa pelas leveduras, pois é um processo oxidativo que exige NAD oxidado e também por OURA⁽³⁾ segundo o qual a formação do ácido succínico seria a principal causa da formação do glicerol.

FORMAÇÃO DE ÁLCOOIS SUPERIORES: durante o processo de biosíntese de alguns aminoácidos como valina, treonina, leucina e isoleucina são produzidos cetoácidos intermediários como descrito por WEBB;INGRAHAM⁽⁴⁾. Ocorre descarboxilação e redução desses ácidos pela descarboxilase pirúvica e desidrogenase alcoólica com produção dos álcoois como esquematizado:



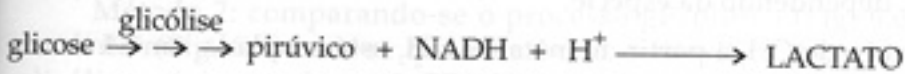
FORMAÇÃO DE ÁCIDO SUCCÍNICO: o ácido succínico é formado durante a fermentação alcoólica, através da fase oxidativa do ciclo de Krebs:



Como em meio anaeróbico não há formação de mitocôndrias ativas, a desidrogenase succínica não apresenta atividade e portanto acumula-se succinato.

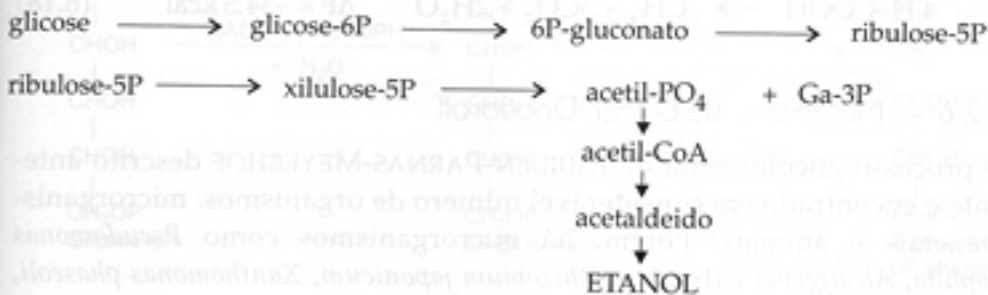
6.2.3 – Fermentação láctica

As bactérias lácticas homofermentativas como *Lactobacillus acidophilus*, *L. lactis*, *L. delbrueckii*, *Streptococcus thermophilus* e *Pediococcus damnosus* fermentam glicose, frutose, galactose, manose, lactose com produção de ácido láctico através da sequência glicolítica. Como o meio é anaeróbio, há necessidade de regeneração de NAD pela desidrogenase láctica:



No caso de galactose, as bactérias lácticas fosforilam até galactose-6P, em seguida é isomerizada até tagatose-6P, fosforilada até tagatose-1,6-diP e cindida nas trioses fosfodiidroxiaçetona e gliceraldeído-3P.

No processo heterofermentativo pode ocorrer, dependendo da espécie envolvida, produção de lactato, etanol, gás carbônico e acetato. A formação de etanol pode ser esquematizada pelas reações:

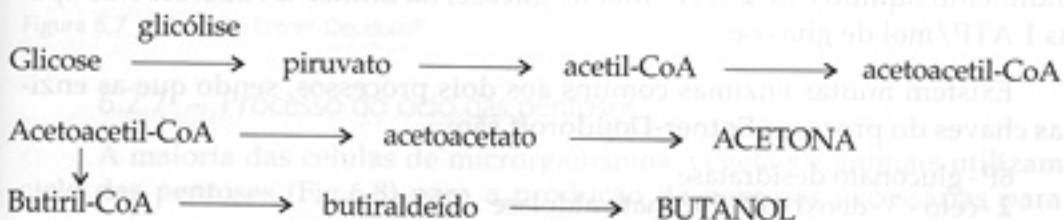


Alguns subprodutos da fermentação láctica, como acetaldeído, acetona, acetoína e diacetil são importantes para o aroma em alimentos produzidos com essas bactérias. Acetaldeído origina-se do piruvato e dos aminoácidos aspártico, metionina e treonina; diacetil e acetoína são produzidos a partir de citrato.

6.2.4 – Fermentação acetona-butanol

A fermentação de açúcares com produção de ácido butírico foi descoberta por PASTEUR em 1861 (GOTTSCHALK(5)). De modo geral, apenas anaeróbios obrigatórios como *Clostridium* são capazes de formar ácido butírico como produto principal da fermentação.

Algumas espécies de *Clostridium*, como *Clostridium acetobutylicum*, são capazes de produzir pequenas quantidades de butanol e acetona, como pode ser visto nas passagens:

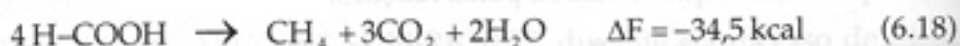
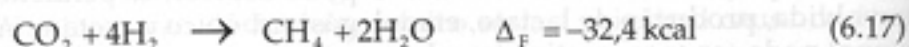
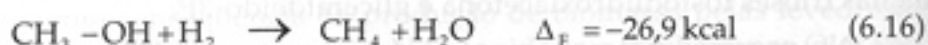


6.2.5 – Formação de metano

Outro processo anaeróbio interessante é a formação de metano pelas bactérias metanogênicas como as *Methanobacterium*, *Methanococcus*, *Methanosarcina* e *Methanobolus*, que conseguem obter energia a partir dos substratos hidrogênio molecular, gás carbônico, ácido fórmico, metanol, metilamina e ácido acético, dependendo da espécie.

A formação de CH_4 a partir de metanol e H_2 está acoplada, em *Methanosarcina barkeri*, com a formação de ATP pela ATP sintase.

Exemplos de capacidade energética de algumas reações:



6.2.6 – Mecanismo de Entner-Doudoroff

O processo glicolítico ou de EMBDEN-PARNAS-MEYERHOF descrito anteriormente é encontrado em considerável número de organismos: microrganismos, vegetais e animais. Porém, há microrganismos como *Pseudomonas saccharophila*, *Alcaligenes eutrophus*, *Rhizobium japonicum*, *Xanthomonas phaseoli*, *Thiobacillus ferrooxidans* que apresentam outro mecanismo para a degradação de açúcares, mecanismo conhecido como de ENTNER-DOUDOROFF(ED). No caso da *Escherichia coli* pode ocorrer a presença das duas vias em função do substrato: na presença de glicose ocorre glicólise e na presença de gluconato a via de Entner-Doudoroff. Esse mecanismo é encontrado em grande número de bactérias gramnegativas.

Como pode ser observado na Fig. 6.7, a glicose-6P é desidrogenada até 6P-gluconato, reação que envolve a presença de NADP e água. Em seguida, 6P-gluconato é convertido em uma molécula de gliceraldeído-3P e uma de piruvato, através da ação das enzimas desidratase e aldolase. Gliceraldeído-3P é oxidado até piruvato pelas enzimas do processo glicolítico. Um ponto interessante para destacar é a produção de ATP, enquanto na sequência glicolítica o rendimento líquido é de 2 ATP/mol de glicose, na Entner-Doudoroff é de apenas 1 ATP/mol de glucose.

Existem muitas enzimas comuns aos dois processos, sendo que as enzimas chaves do processo Entner-Doudoroff são:

6P-gluconato desidratase

2-ceto-3-deoxi-6P gluconato aldolase

Dois métodos podem ser utilizados para detectar qual processo a célula está utilizando para a degradação de açúcares:

Método 1: coletar as células crescidas em glicose; extrair as enzimas e detectar as atividades. Se níveis elevados de 6P-gluconato desidratase e 2-ceto-3-deoxi-6P-gluconato aldolase e baixos níveis de fosfofrutoquinase forem encontrados, trata-se de um organismo realizando o processo ED.

Método 2: comparando-se o processo glicolítico (Fig. 6.6) com o processo ED (Fig. 6.7) nota-se que o carbono carboxílico do ácido pirúvico na glicólise origina-se dos carbonos 3 e 4 da glicose, enquanto no processo ED origina-se dos carbonos 1 e 3 da glicose. Assim o método de radiorrespirometria, utilizando glicose com os carbonos 1,3 e 4 radioativos, pode ser utilizado para essa diferenciação.

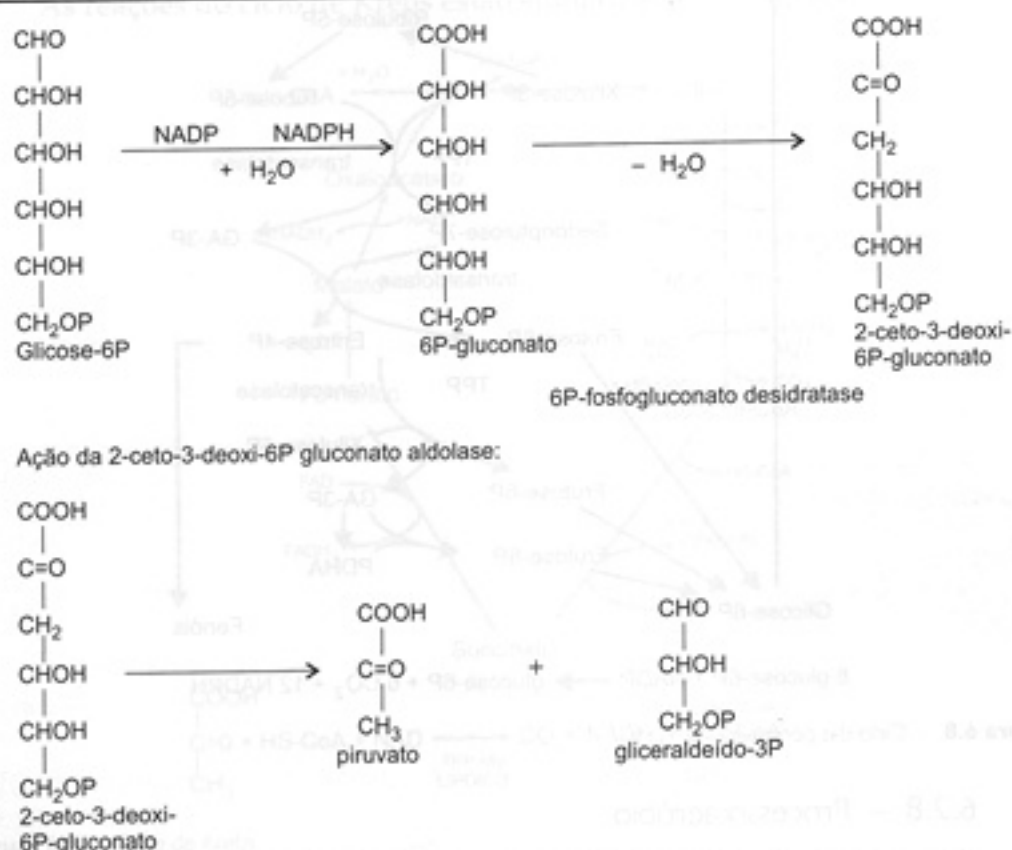


Figura 6.7 – Processo Entner-Doudoroff

6.2.7 – Processo do ciclo das pentoses

A maioria das células de microrganismos, vegetais e animais utilizam o ciclo das pentoses (Fig.6.8) para a produção de pentoses necessárias para a

formação dos nucleotídeos dos ácidos nucleicos, ATP, coenzimas, etc., além da formação de $\text{NADPH} + \text{H}^+$ para os processos biossintéticos.

Alguns microrganismos como *Thiobacillus novellus* e *Brucella abortus* são deficientes em enzimas chaves dos processos glicolíticos e ED, entretanto crescem em meio de glicose. Essas bactérias utilizam-se do ciclo das pentoses, desviando gliceraldeído-3P para oxidação até piruvato e posteriormente do ciclo de Krebs para a produção de energia acoplado ao transporte de elétrons. Também há a possibilidade de excreção de acetato, como ocorre na *Gluconobacter*, bactéria acética que apresenta o ciclo de Krebs operando parcialmente.

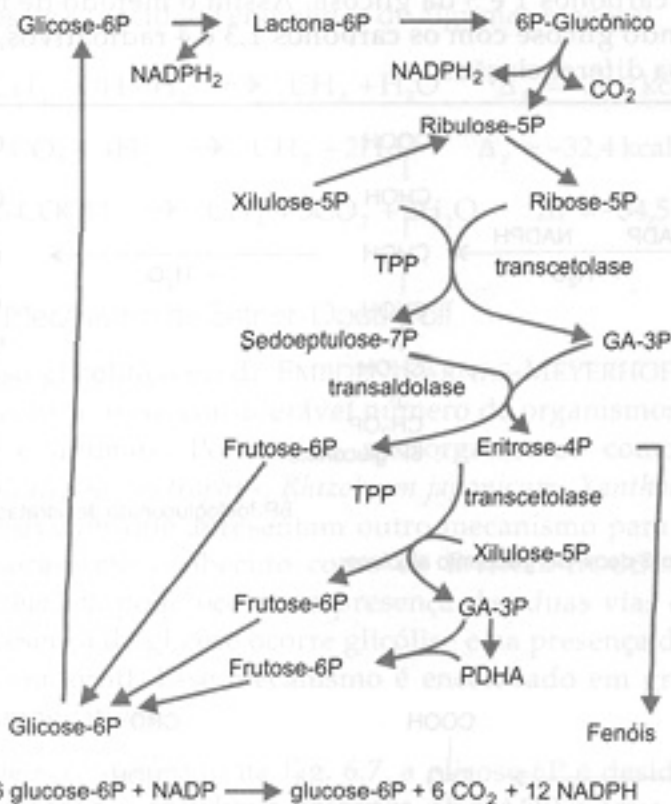


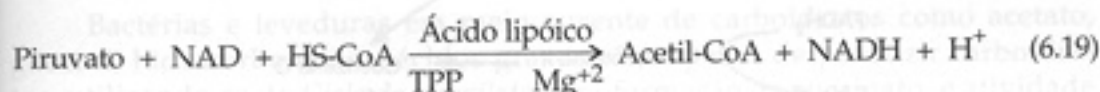
Figura 6.8 – Ciclo das pentoses

6.2.8 – Processo aeróbio

Os organismos, que se utilizam do ciclo de Krebs (ciclo do ácido cítrico ou dos ácidos tricarboxílicos) para a produção de coenzimas reduzidas para a cadeia respiratória e de compostos precursores para as biossínteses, são mais eficientes no processo de obter energia a partir da glicose, podendo ainda realizar essa obtenção a partir da degradação de ácidos graxos e aminoácidos.

Para a operação do ciclo de Krebs a partir de piruvato há necessidade da reação inicial de ativação com a formação de acetil-coenzima A. O complexo

enzimático da piruvato oxidase, que exige os co-fatores NAD, coenzima A, pirofosfato de tiamina, ácido lipóico e magnésio, converte piruvato em acetil-CoA conforme a reação:



Acetil-CoA pode ainda ser formado a partir da betaoxidação dos ácidos graxos e da oxidação de aminoácidos.

Componentes do ciclo de Krebs como alfacetoglutarato e oxaloacetato são precursores para a síntese de glutamato e aspartato, respectivamente. Succinil-CoA é precursor para a síntese das porfirinas.

As reações do ciclo de Krebs estão sumarizadas na Fig. 6.9.

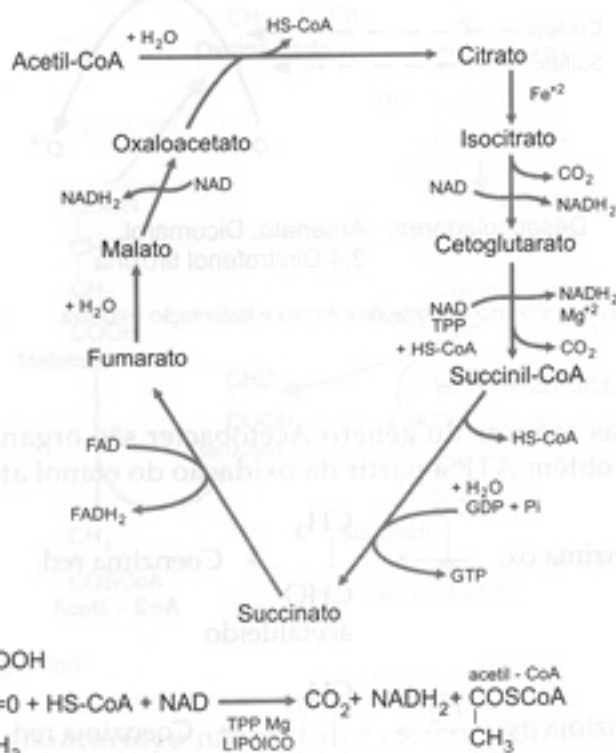


Figura 6.9 – Ciclo de Krebs

As coenzimas FADH₂ e NADH + H⁺ são reoxidadas no processo do transporte de elétrons acoplado à fosforilação oxidativa, conforme esquema apresentado na Fig. 6.10. Deve-se chamar atenção para a necessidade de algumas vitaminas do complexo B para a formação das coenzimas atuantes no processo aeróbico de obtenção de energia: niacina (NAD), tiamina (TPP), riboflavina (FAD), ácido pantotênico (coenzima A).

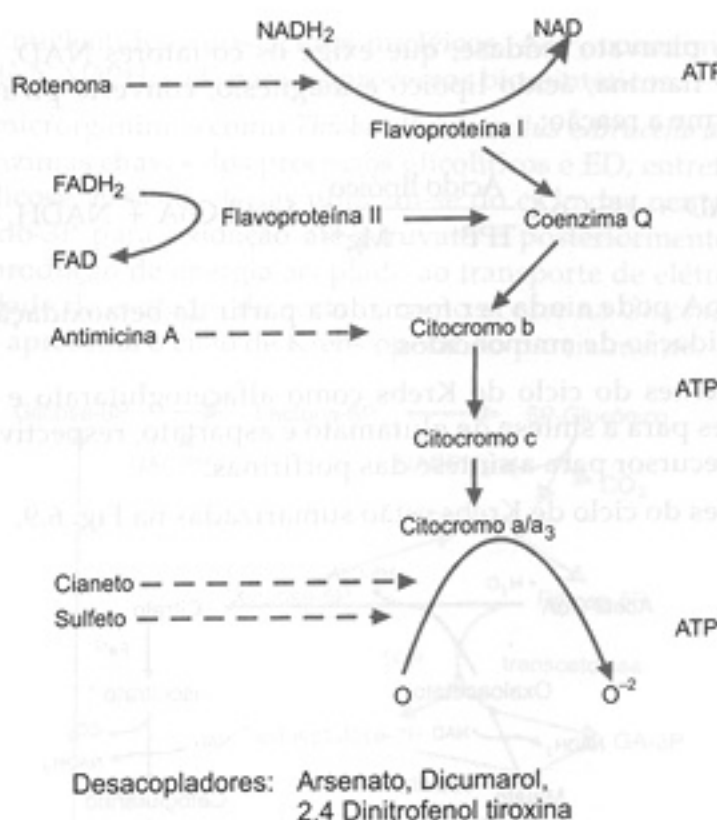
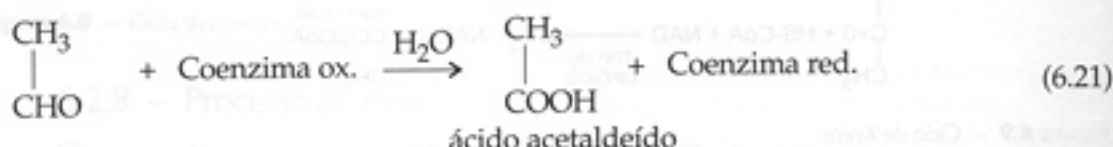
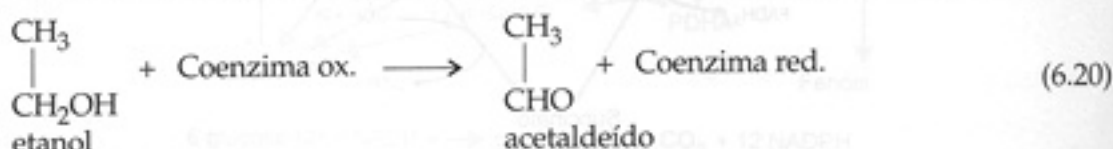


Figura 6.10 – Cadeia respiratória: transporte de elétrons e fosforilação oxidativa

6.2.8.1 – Bactérias acéticas

As bactérias acéticas do gênero *Acetobacter* são organismos estritamente aeróbios, que obtêm ATP a partir da oxidação do etanol até ácido acético:



As coenzimas reduzidas são transferidas para citocromos da cadeia respiratória, gerando força protonmotiva para a formação de ATP. O ácido acético é excretado, podendo atingir concentrações elevadas no meio, por exemplo, de 100 g/L em condições ideais de oxigenação.

Se etanol não está mais disponível, o ciclo de Krebs passa a operar de modo completo e o ácido acético pode ser oxidado até gás carbônico e água.

6.3 – Biossíntese

6.3.1 – Carboidratos

Bactérias e leveduras em meio ausente de carboidratos como acetato, glicerol, hidrocarbonetos e ácidos graxos são capazes de produzir carboidratos, utilizando-se do *Ciclo do glioxilato* para formação de succinato, e atividade de gliconeogênese com as enzimas reversíveis da glicólise, como pode ser observado nas Figs.6.11 e 6.12.

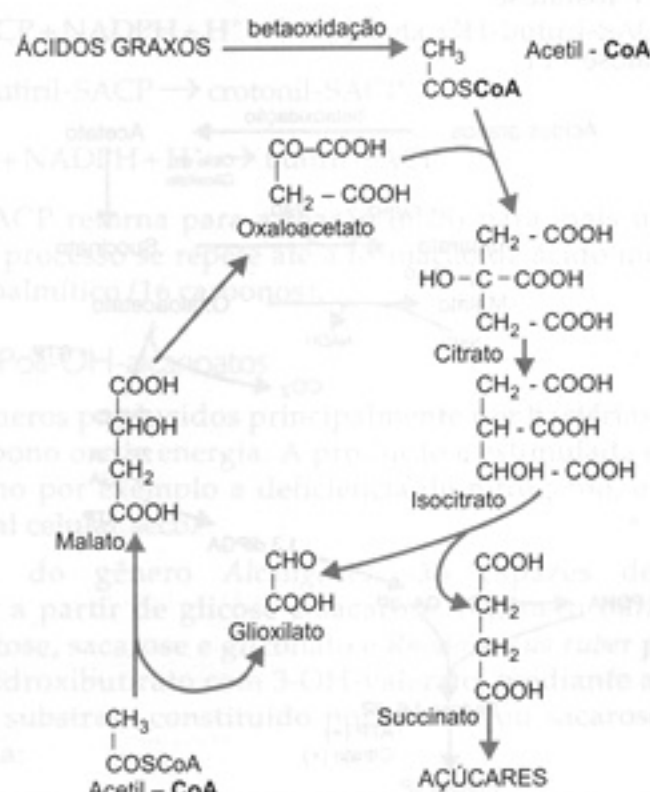
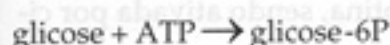


Figura 6.11 – Ciclo do glioxilato

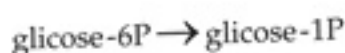
A trealose, dissacarídeo não redutor constituído por duas unidades de glicose unidas pelo carbono anomérico, é um carboidrato com função de proteção contra agentes estressantes e de reserva nas células vegetativas de leveduras e esporos de fungos.

A biossíntese da trealose é realizada pelas enzimas sintetase de trealose-P e trealose-P fosfatase a partir de glicose, como esquematizado:

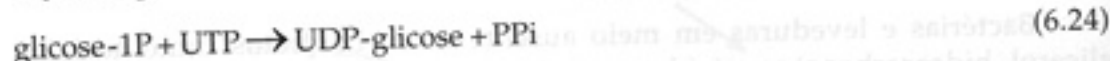
Ação da hexoquinase e fosfoglucomutase



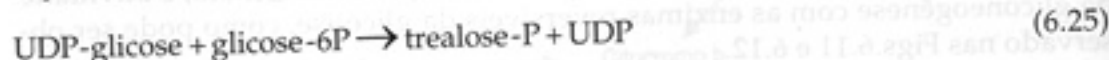
(6.22)



Ação da pirofosforilase



Ação da sintetase de tralose-P



Ação da tralose-P fosfatase

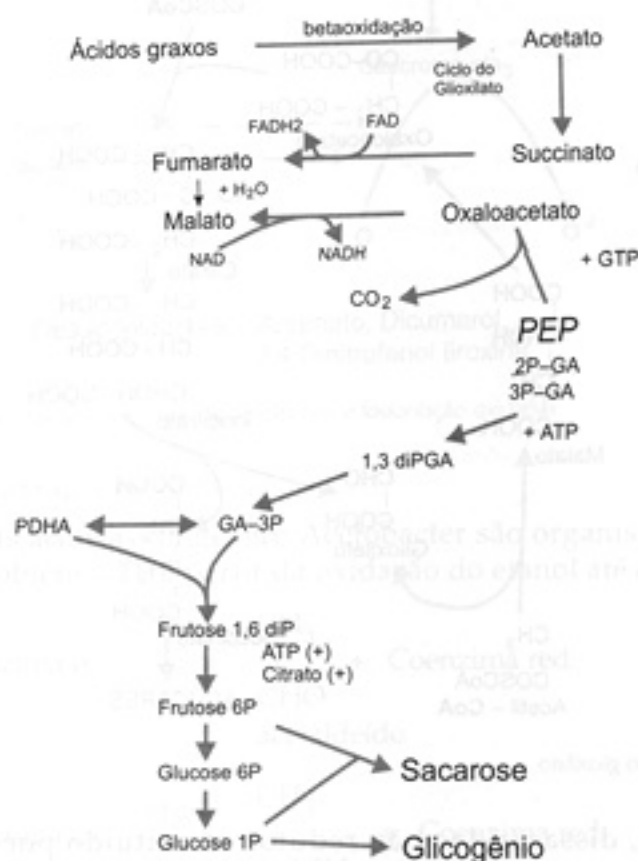
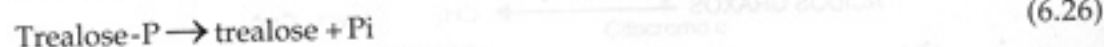


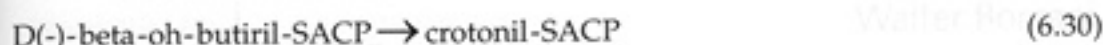
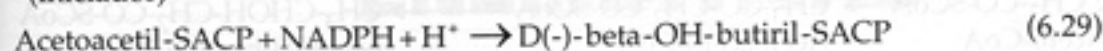
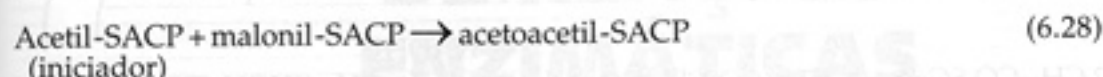
Figura 6.12 – Gliconeogênese

6.3.2 – Ácidos graxos

O sistema para síntese de ácidos graxos saturados a partir de acetil-CoA está localizado no citossol. A acetil-CoA, enzima alostérica inibida por acil-CoA de cadeia longa, é o primeiro passo para a síntese, produzindo malonil-CoA a partir de acetil-CoA e exigindo o ATP e biotina, sendo ativada por citrato e frutose-1,6-diP.



O complexo enzimático da sintetase de ácidos graxos realiza a condensação do malonil e exige que o radical acil esteja ligado ao grupo sulfidríla da proteína carregadora de grupos acil (ACP), de modo semelhante ao que ocorre com a coenzima A. Resumidamente, o processo pode ser esquematizado com as seguintes passagens:

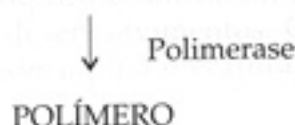
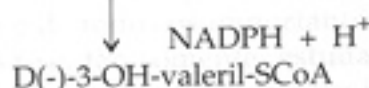
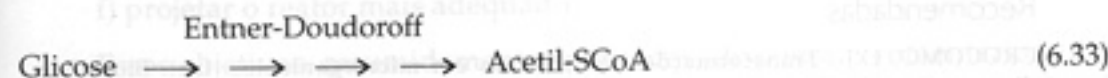
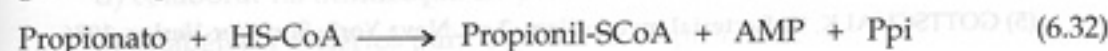


Butiril-SACP retorna para a reação (6.28) para mais uma incorporação de malonil e o processo se repete até a formação de ácido mirístico (14 carbonos) ou ácido palmítico (16 carbonos).

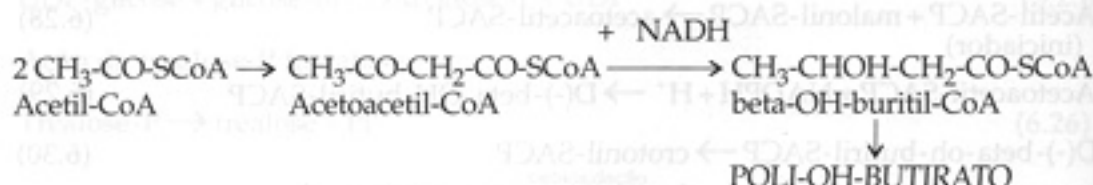
6.3.3 – Poli-OH-alcanoatos

São polímeros produzidos principalmente por bactérias com a função de reserva de carbono ou de energia. A produção é estimulada em determinadas condições, como por exemplo a deficiência de nitrogênio, e pode atingir até 80% do material celular seco.

Bactérias do gênero *Alcaligenes* são capazes de produzir poli-OH-butilato a partir de glicose e sacarose, o gênero *Burkholderia* a partir de glicose, frutose, sacarose e gliconato e *Rhodococcus ruber* produz um copolímero de poli-hidroxibutilato com 3-OH-valerato, mediante a adição de ácido propiônico ao substrato constituído por glicose ou sacarose, segundo o seguinte esquema:



Poli-OH butirato é um polímero do D(-)-beta-OH butirato com peso molecular entre 60.000 e 250.000. É considerado como reserva de energia característica de procariotos como: *Alcaligenes eutrophus*, *Azotobacter vinelandii*, *Bacillus megaterium*, *Pseudomonas multivorans*, *Rhodospirillum rubrum*, *Schaerottius natans*, bacilos de modo geral e bactérias fototrópicas. Acumula-se nas células, como granulos cercados por membranas, em condições de deficiência de nitrogênio. As reações de síntese estão apresentadas na seqüência:



Referências bibliográficas

Citadas

- (1) KOSHLAND, D.E.JR.; WESTHEIMER, F.H. *Journal American Chemical Society*, v.72, p.3383-3388. 1950.
- (2) NORDSTROM, K. Yeast growth and glycerol formation. *Acta Chemica Scandinavica*, v. 20, n.4, p.1016-1025, 1966.
- (3) OURA, E. Reaction products of yeast fermentations. *Process Biochemistry*, v.12, p.19-35, 1977.
- (4) WEBB, A.D.; INGRAHAM, J.L. Fusel Oil. *Advances in Applied Microbiology*, v. 5, p.317-53, 1963.
- (5) GOTTSCHALK, G. *Bacterial metabolism*. 2.ed. Nova York, Springer-Verlag, 1986.

Recomendadas

- CROCOMO, O.J., *Transformações metabólicas em microrganismos*. Inst. Biol. Pesq. Tecn.E.Paraná, Curitiba, PR, 1967
- LEHNINGER, A.L., *Principles of Biochemistry*. Nova York, Worth Publishers, 1982.

7

CINÉTICA DE REAÇÕES ENZIMÁTICAS

Walter Borzani

7.1 – Introdução

A Cinética de Reações Enzimáticas é, a rigor, um caso particular da Cinética Química. Seus objetivos são:

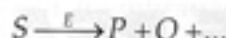
- a) medir as velocidades das transformações que se processam;
- b) estudar a influência de condições de trabalho (como, por exemplo, concentrações dos reagentes e das enzimas, temperatura, pH, concentrações de ativadores e de inibidores) naquelas velocidades;
- c) correlacionar (quer por meio de equações empíricas, quer por meio de modelos matemáticos) as velocidades das transformações com alguns dos fatores que as afetam;
- d) colaborar na otimização do processo considerado;
- e) estabelecer critérios para o controle do processo;
- f) projetar o reator mais adequado.

Esses objetivos, resumidamente apontados, dispensam comentários adicionais relativos à importância prática desse estudo.

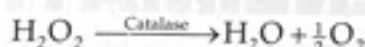
Em um curso de graduação não cabe um estudo aprofundado, com vistas ao exame de todos os casos conhecidos e de todos os importantes pormenores inerentes a sistemas complexos. Visa-se, tão somente, estudar alguns casos simples, com o principal objetivo de adquirir e consolidar conhecimentos fundamentais indispensáveis a futuros desenvolvimentos. Os interessados em um estudo mais completo poderão consultar a literatura indicada no final deste capítulo.

7.2 – Medida da velocidade

Consideremos o caso em que, em solução aquosa, um dado substrato, de fórmula molecular S , é transformado em produtos de fórmulas moleculares P , Q , etc., em uma reação catalisada por uma enzima de fórmula molecular E . Esquematicamente:



Como exemplo, poderíamos citar a decomposição da água oxigenada em água e oxigênio, na presença da enzima catalase:



O primeiro problema que se nos apresenta, ao pretendermos estudar a cinética da reação, é a medida de sua velocidade em condições experimentais conhecidas.

Suponhamos que seja possível, no sistema que nos interessa, medir a concentração do substrato (ou de um dos produtos) durante o desenvolvimento da reação a partir de seu início. Essas medidas conduzirão a curvas do tipo das representadas na Fig. 7.1. Essas curvas nos mostram que a velocidade de consumo do substrato (ou de formação do produto escolhido) varia com o tempo, porque, como consequência da reação, variam as condições em que o sistema se encontra. De fato, durante o desenvolvimento da reação, mesmo mantendo-se constantes a temperatura e o pH, a concentração do substrato decresce e a concentração da enzima, levando em conta sua labilidade, também pode diminuir consideravelmente, sem esquecer que, em muitos casos, os produtos formados podem atuar como inibidores da ação catalítica da enzima.

A rigor, portanto, o único instante em que as condições experimentais são conhecidas é o instante inicial. Por esse motivo, a velocidade da reação enzimática deve ser calculada, sempre que possível, no instante $t=0$, obtendo-se assim a *velocidade inicial* ou de consumo do substrato, ou de formação do produto (ver Fig. 7.1).

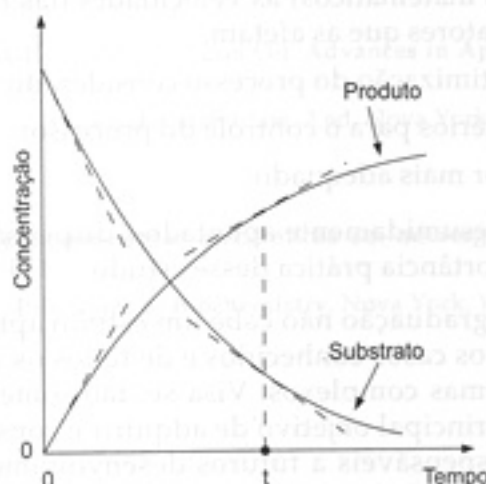


Figura 7.1 – Representação esquemática das variações das concentrações do substrato e do produto. Medidas das velocidades no instante t e das velocidades iniciais ($t=0$).

Muitas são as reações enzimáticas cujas velocidades iniciais podem ser determinadas, desde que se tomem os devidos cuidados experimentais. Além da já citada decomposição da água oxigenada, poderíamos citar, a título de exemplos, a hidrólise da sacarose catalisada pela invertase e a hidrólise da uréia, catalisada pela urease.

Há, porém, casos mais complexos, em que a velocidade inicial não pode ser medida, ou porque não existe uma técnica experimental que permita acompanhar as variações das concentrações no sistema em estudo, ou porque a transformação não pode ser representada por uma equação química com reagentes e produtos bem definidos. A velocidade da reação, nesses casos, é freqüentemente representada por uma *velocidade média* de consumo, ou de produção, de substâncias convenientemente escolhidas (ver Fig. 7.2) ou, ainda, de variação de uma propriedade do sistema (viscosidade, textura, absorvância, etc.) em um intervalo de tempo prefixado. O amolecimento de carnes pela ação da papaína é um exemplo de processo enzimático em que não há condições de medir uma velocidade inicial.

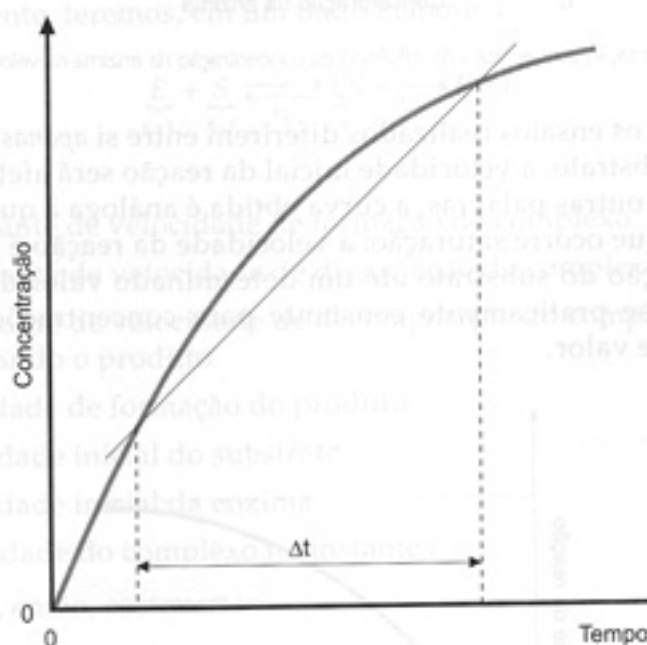


Figura 7.2 – Medida da velocidade média de formação do produto no intervalo de tempo Δt .

7.3 – Influência das concentrações da enzima e do substrato. Lei de Michaelis e Menten.

Consideremos uma dada reação enzimática cuja *velocidade inicial* pode ser determinada experimentalmente. Imaginemos vários ensaios diferindo, um do outro, apenas pela concentração inicial da enzima. A experiência mos-

tra que, dentro de certos limites, a velocidade da reação é proporcional à concentração da enzima (Fig. 7.3).

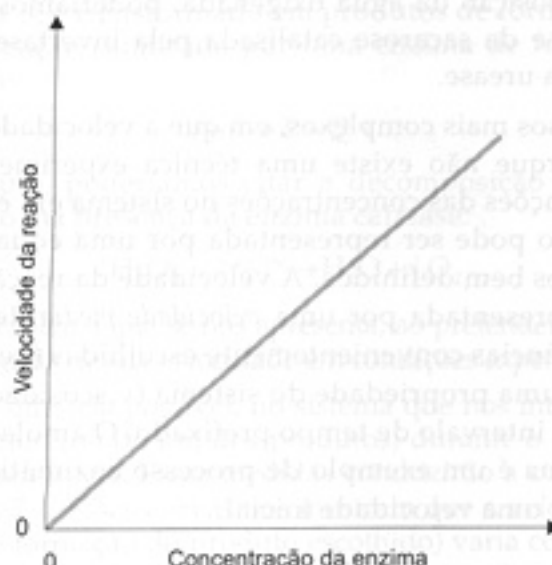


Figura 7.3 — Representação esquemática da influência da concentração da enzima na velocidade da reação.

Se, porém, os ensaios realizados diferirem entre si *apenas* pela concentração inicial do substrato, a velocidade inicial da reação será afetada, como indica a Fig. 7.4. Em outras palavras, a curva obtida é análoga à que se observa em fenômenos em que ocorre saturação: a velocidade da reação é função crescente da concentração do substrato até um determinado valor dessa concentração, mantendo-se praticamente constante para concentrações de substrato superiores a esse valor.

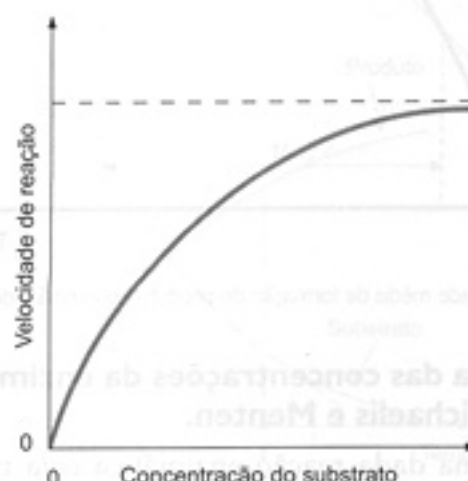


Figura 7.4 — Representação esquemática da influência da concentração do substrato na velocidade da reação.

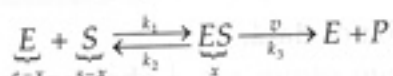
O modelo cinético de Michaelis e Menten é, ainda hoje, um dos mais aceitos com o objetivo básico de explicar a influência das concentrações iniciais de enzima e de substrato na velocidade inicial da reação enzimática. As hipóteses básicas desse modelo são:

- a) o substrato e a enzima reagem reversivelmente entre si formando um composto intermediário denominado *complexo enzima-substrato*;
- b) o complexo formado ou se decompõe, ou reage com outra substância, regenerando a enzima e formando os produtos da reação.

Consideremos o caso mais simples possível, caracterizado pelos seguintes pontos:

- a) a formação do complexo enzima-substrato se dá na proporção de 1 mol de substrato para 1 mol de enzima, produzindo 1 mol do complexo;
- b) o complexo formado se decompõe, sem reagir com outras substâncias existentes no sistema.

Esquemáticamente, teremos, em um dado instante t :



sendo:

- k_1 = constante de velocidade de formação do complexo
 k_2 = constante de velocidade de dissociação do complexo
 k_3 = constante de velocidade de decomposição do complexo formando o produto

v = velocidade de formação do produto

s = molaridade inicial do substrato

e = molaridade inicial da enzima

x = molaridade do complexo no instante t

Podemos, então, escrever:

$$\frac{dx}{dt} = k_1(e-x)(s-x) - k_2 \cdot x - k_3 \cdot x \quad (7.1)$$

Admitindo, o que é muito comum na prática, que a concentração do substrato é muito maior que a da enzima e , portanto, muito maior que a do complexo, podemos desprezar x em relação a s . A eq. (7.1) será, então:

$$\frac{dx}{dt} = k_1(e-x)s - (k_2 + k_3) \cdot x \quad (7.2)$$

Supondo, ainda, que após um regime transiente inicial muito curto (da ordem de alguns microssegundos), a concentração do complexo se mantém constante (hipótese de Briggs e Haldane), isto é, $dx/dt=0$, a eq. (7.2) fornece:

$$x = \frac{k_1 \cdot e \cdot s}{k_2 + k_3 + k_1 \cdot s} = \frac{e \cdot s}{K_m + s} \quad (7.3)$$

sendo:

$$K_m = (k_2 + k_3)/k_1 \quad (7.4)$$

A eq. (7.3) permite, agora, calcular a velocidade de formação do produto:

$$v = k_3 \cdot x = k_3 \cdot e \frac{s}{K_m + s} \quad (7.5)$$

O máximo valor da velocidade será alcançado quando toda a enzima se encontrar na forma de complexo, isto é, quando $x=e$. Indicando-se com V essa velocidade máxima, teremos $V = k_3 \cdot e$.

Logo, a equação (7.5) nos dará:

$$v = V \frac{s}{K_m + s} \quad (7.6)$$

que é a equação de Michaelis e Menten, representada na Fig. 7.5.

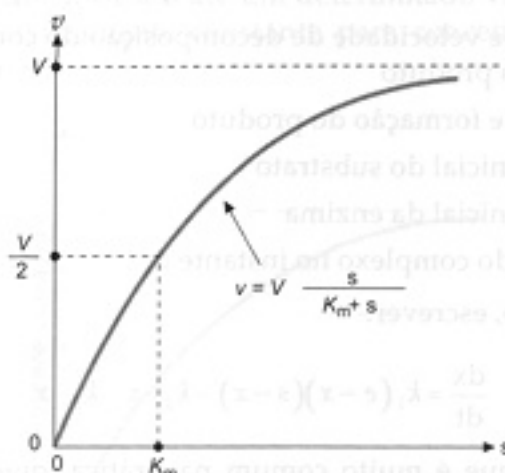


Figura 7.5 – Representação esquemática da equação de Michaelis e Menten.

A constante K_m , denominada constante de Michaelis da enzima (ou, segundo alguns autores, constante de Michaelis do substrato, ou ainda constan-

te de Michaelis do sistema enzima-substrato), é a concentração de substrato à qual corresponde uma velocidade igual à metade da máxima. De fato, fazendo $s=K_m$ na equação (7.6), resulta $v=V/2$. A tab. 7.1 reúne alguns valores de K_m .

Tabela 7.1 – Valores da Constante de Michaelis

ENZIMA	SUBSTRATO	K_m
Invertase	Sacarose	0,020 mol/L
Urease	Uréia	0,025 mol/L
Catalase	H_2O_2	0,025 mol/L
Amilase	Amido	4,0 g/L

Se a constante de velocidade k_3 for muito menor do que k_2 , a eq. (7.4) dará:

$$K_m \cong \frac{k_2}{k_1} \quad (7.7)$$

isto é, K_m será, neste caso, praticamente igual à constante de equilíbrio de dissociação do complexo ES.

Quanto menor for o valor de K_m , maior será a afinidade da enzima pelo substrato.

A determinação de K_m e V a partir de valores experimentais de s e v , pode ser efetuada linearizando-se a eq. (7.6).

Para tanto, um método muito utilizado, chamado método de Lineweaver-Burk, consiste em inverter ambos os membros da eq. (7.6):

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V} + \frac{K_m}{V} \cdot \frac{1}{s} \quad (7.8)$$

Essa última equação nos diz que $1/v$ varia linearmente com $1/s$. Os coeficientes linear e angular dessa reta são iguais a $1/V$ e K_m/V , respectivamente.

Tendo-se os valores experimentais de s e os correspondentes valores de v determina-se, por regressão linear, os valores de $1/V$ e K_m/V e, conseqüentemente, V e K_m (ver Fig. 7.6).

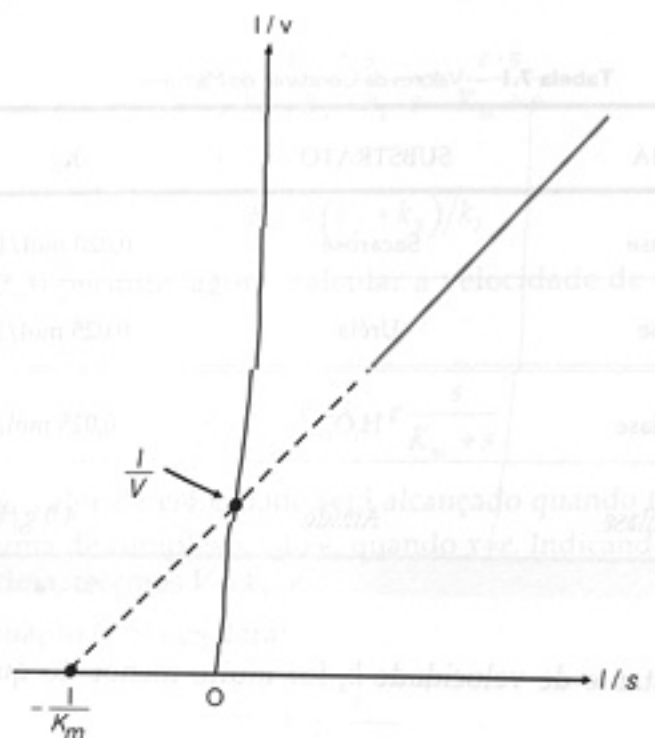


Figura 7.6 – Representação esquemática da determinação de V e K_m pelo método de Lineweaver-Burk.

A linearização da eq. (7.6) pode ser realizada por outros métodos, além do de Lineweaver-Burk já citado. Faremos referência apenas a mais um deles, o método de Hanes, que consiste simplesmente em multiplicar por s ambos os membros da eq. (7.8):

$$\frac{s}{v} = \frac{K_m}{V} + \frac{1}{V} \cdot s \quad (7.9)$$

Neste último método, s/v varia linearmente com s e os coeficientes linear e angular da reta correspondente são respectivamente iguais a K_m/V e $1/V$.

Qualquer que seja o método utilizado, uma boa determinação de K_m e V requer uma cuidadosa análise estatística dos valores experimentais.

A título de exemplo, consideremos os valores da Tab. 7.2, que nos dá, em uma reação enzimática, a velocidade inicial de formação do produto para diversos valores da concentração inicial do substrato (ver Fig. 7.7).

Tabela 7.2 – Velocidade inicial de formação do produto em função da concentração inicial do substrato.

s (g/L)	v (g/L·h)
0,25	0,78
0,51	1,25
1,03	1,66
2,52	2,19
4,33	2,35
7,25	2,57

7.4 – Influência da concentração do substrato

Chama-se inibidor da reação enzimática a substância que provoca a diminuição da velocidade da reação.

Quando o inibidor reage irreversivelmente com a enzima, bloqueando-a parcial ou totalmente, a inibição é do tipo não competitiva. Se, porém, o inibidor reage reversivelmente com a enzima, a inibição é do tipo chamada reversível. Esse último caso é o que trataremos neste capítulo e este tipo de inibição será considerado neste capítulo.

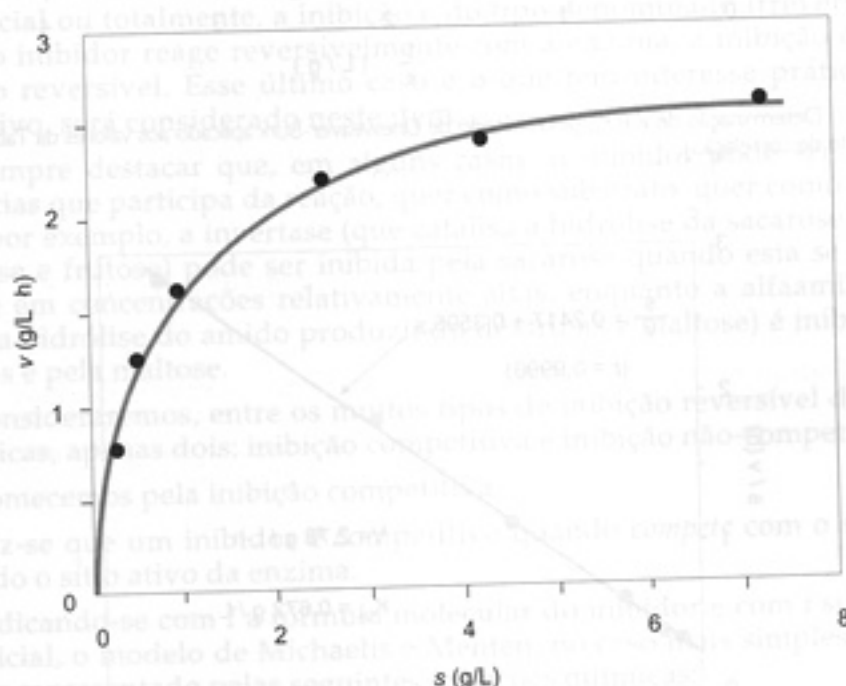
Cumpramos, por exemplo, a reação de hidrólise do açúcar, formando o glicose e frutose, que pode ser inibida pela sacarose quando esta se encontra presente em concentrações relativamente altas, enquanto a amilase (que catalisa a hidrólise do amido produzindo glicose e frutose) é inibida pelas dextrinas e pela maltose.

Consideremos, entre os muitos tipos de inibição reversível de reações enzimáticas, apenas dois: inibição competitiva e inibição não competitiva.

Começamos pela inibição competitiva.

Diz-se que um inibidor é competitivo quando compete com o substrato, ocupando o sítio ativo da enzima.

Indicando-se com s a concentração molar do substrato e com v a velocidade inicial, o modelo de Michaelis-Menten para a inibição competitiva pode ser representado pelas seguintes equações:

Figura 7.7 – Representação gráfica dos valores da Tabela 7.2.

Se aplicarmos, aos valores da Tab. 7.2, o método de Lineweaver-Burk e o de Hanes, obteremos os resultados representados, respectivamente nas Figs. 7.8 e 7.9.

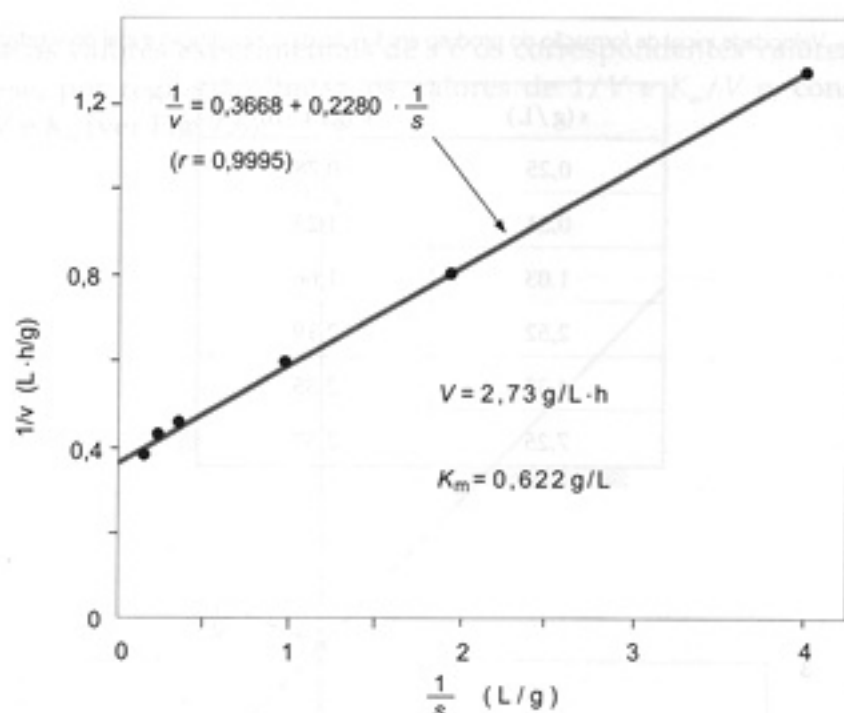


Figura 7.8 – Determinação de V e K_m pelo método de Lineweaver-Burk aplicado aos valores da Tabela 7.2 (r = coeficiente de correlação).

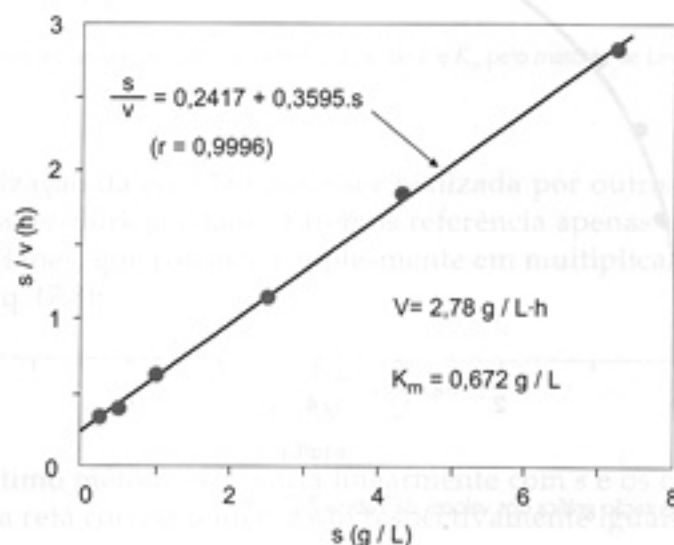


Figura 7.9 – Determinação de V e K_m pelo método de Hanes aplicado aos valores da Tabela 7.2 (r = coeficiente de correlação).

Resta-nos examinar a ordem da reação enzimática em duas situações particulares.

Se a concentração do substrato for muito menor que K_m , isto é, se $K_m + s \cong K_m$, a eq. (7.6) nos dará:

$$v \cong \frac{V}{K_m} \cdot s$$

isto é, a reação se comporta como se fosse de primeira ordem.

Se, porém, a concentração do substrato for muito maior do que K_m , de modo que $K_m + s \cong s$, teremos, pela eq. (7.6):

$$v \cong V$$

ou seja, a reação se comporta como se fosse de ordem zero.

7.4 – Influência da presença de um inibidor

Chama-se inibidor da reação enzimática uma substância que acarreta diminuição da velocidade da reação.

Quando o inibidor reage irreversivelmente com a enzima, bloqueando-a parcial ou totalmente, a inibição é do tipo denominado irreversível. Se, porém, o inibidor reage reversivelmente com a enzima, a inibição é do tipo chamado reversível. Esse último caso é o que tem interesse prático e, por este motivo, será considerado neste item.

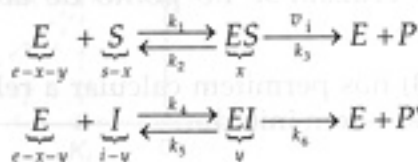
Cumpra destacar que, em alguns casos, o inibidor pode ser uma das substâncias que participa da reação, quer como substrato, quer como produto. Assim, por exemplo, a invertase (que catalisa a hidrólise da sacarose, formando glicose e frutose) pode ser inibida pela sacarose quando esta se encontra presente em concentrações relativamente altas, enquanto a alfaamilase (que catalisa a hidrólise do amido produzindo dextrinas e maltose) é inibida pelas dextrinas e pela maltose.

Consideraremos, entre os muitos tipos de inibição reversível de reações enzimáticas, apenas dois: inibição competitiva e inibição não-competitiva.

Começemos pela inibição competitiva.

Diz-se que um inibidor é competitivo quando *compete* com o substrato, ocupando o sítio ativo da enzima.

Indicando-se com I a fórmula molecular do inibidor e com i sua molaridade inicial, o modelo de Michaelis e Menten, no caso mais simples possível, pode ser representado pelas seguintes equações químicas:



onde v_i , velocidade de formação do produto P , é obviamente menor que v (ver item 7.3), uma vez que parte da enzima está "bloqueada" na reação com o inibidor I .

Teremos então, uma vez que, na prática, $s \gg x$ e $i \gg y$:

$$\frac{dx}{dt} = k_1(e - x - y)s - (k_2 + k_3)x \quad (7.10)$$

$$\frac{dy}{dt} = k_4(e - x - y)i - (k_5 + k_6)y \quad (7.11)$$

Cumpra destacar que na reação entre a enzima e o inibidor pode não ocorrer a formação do produto P' , isto é, pode-se ter apenas:



e, conseqüentemente, $k_6 = 0$

Sendo $dx/dt = dy/dt = 0$ (ver item 7.3: hipótese de Briggs e Haldane), as eqs. (7.10) e (7.11) nos darão:

$$x = \frac{e \cdot s}{K_m(1 + i/K_i) + s} \quad (7.12)$$

sendo $K_m = (k_2 + k_3)/k_1$ e $K_i = (k_5 + k_6)/k_4$.

A velocidade v_i será, então:

$$v_i = k_3 \cdot x = V \cdot \frac{s}{K_m(1 + i/K_i) + s} \quad (7.13)$$

onde $V = k_3 \cdot e$.

Aplicando-se, na equação (7.13), o método de Lineawer-Burk, teremos:

$$\frac{1}{v_i} = \frac{1}{V} + \frac{K_m(1 + i/K_i)}{V} \cdot \frac{1}{s} \quad (7.14)$$

representada esquematicamente na Fig. 7.10.

A eq. (7.14) pode ainda ser graficamente representada colocando-se, em abscissas, a concentração do inibidor em vez de $1/s$, como nos mostra a Fig. 7.11. Pode-se aqui demonstrar que as retas obtidas para diferentes concentrações de substrato cruzam-se no ponto de abscissa $-K_i$ e ordenada, $1/V$.

As eqs. (7.6) e (7.13) nos permitem calcular a relação entre as velocidades da reação sem inibidor e com inibidor:

$$\frac{v}{v_i} = 1 + \frac{K_m}{K_i(K_m + s)} \cdot i \quad (7.15)$$

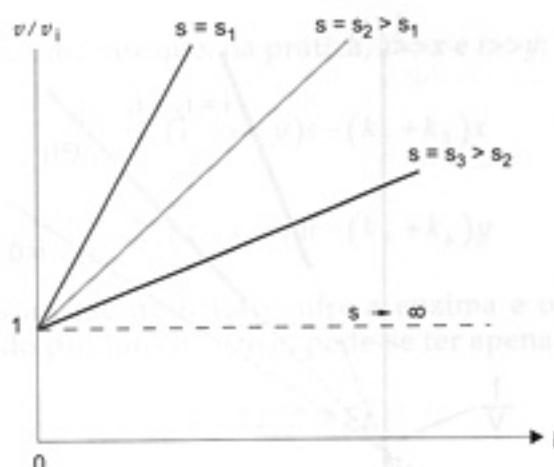


Figura 7.12 – Representação esquemática da influência das concentrações do substrato e do inibidor competitivo na relação v/v_i .

Essa última equação, representada na Fig. 7.12, nos mostra a influência das concentrações do substrato e do inibidor na relação v/v_i . Em particular, se for possível trabalhar com concentrações de substrato relativamente altas (matematicamente, $s \rightarrow \infty$), a influência do inibidor pode se tornar desprezível. Essa tendência pode ser também observada no exemplo numérico representado na Fig. 7.13, no qual $V=6,10$ mg/L·min, $K_m=2,50$ mg/L e $K_i=1,60$ mg/L.

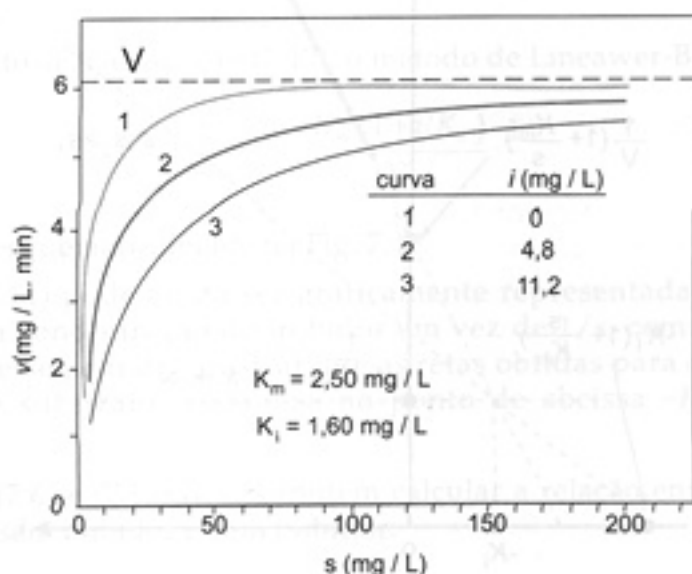
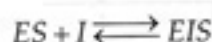
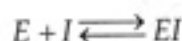


Figura 7.13 – Exemplo numérico da influência das concentrações do substrato e do inibidor competitivo na velocidade da reação.

Um exemplo de inibição competitiva é o observado no efeito inibidor da glicose na hidrólise da sacarose, catalisada pela invertase. A inibição, provocada pela alfadextrina na hidrólise de amido catalisada pela alfaamilase, é outro exemplo de inibição competitiva.

Uma vez examinados os pontos fundamentais da influência de um inibidor competitivo na velocidade da reação enzimática, passemos ao exame de um caso simples de inibição não competitiva.

Nesse tipo de inibição, o inibidor não compete com o substrato pelo sítio ativo, mas vai ocupar outro sítio da enzima (sítio regulativo ou de inibição) como indicado, esquematicamente, a seguir:



formando-se, além dos complexos ES e EI , um terceiro complexo, enzima-inibidor-substrato (EIS).

A velocidade da reação enzimática será, neste caso:

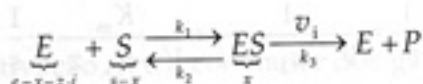
$$v = V \cdot \frac{K_i}{K_i + i} \cdot \frac{s}{K_m + s} \quad (7.16)$$

7.5 - Influência da temperatura

Como exemplos de inibição não competitiva podem ser citados os efeitos inibidores, tanto da maltose quanto da dextrina limite na hidrólise do amido catalisada pela alfa-amilase.

Finalmente, parece-nos aconselhável examinar o caso de inibição não competitiva *irreversível*, ou seja, quando o inibidor reage irreversivelmente com a enzima bloqueando-a em parte, como acontece quando o inibidor é um metal pesado.

Sendo i a molaridade inicial do inibidor e indicando com $z \cdot i$ a molaridade de enzima por ele bloqueada, o modelo de Michaelis e Menten pode ser representado pelas seguintes equações químicas:



Considerando que $s - x \cong s$, podemos escrever:

$$\frac{dx}{dt} = k_1(e - x - z \cdot i)s - (k_2 + k_3)x = 0 \quad (7.17)$$

Logo:

$$x = \frac{(e - z \cdot i)s}{K_m + s} \quad (7.18)$$

onde: $K_m = (k_2 + k_3)/k_1$.

Teremos, então:

$$v_i = k_3 \cdot x = (k_3 \cdot e - k_3 \cdot z \cdot i) \cdot \frac{s}{K_m + s} \quad (7.19)$$

Considerando que $k_3 \cdot e = V$, resulta:

$$v_i = (V - k_3 \cdot z \cdot i) \cdot \frac{s}{K_m + s} \quad (7.20)$$

representada graficamente na Fig. 7.14.

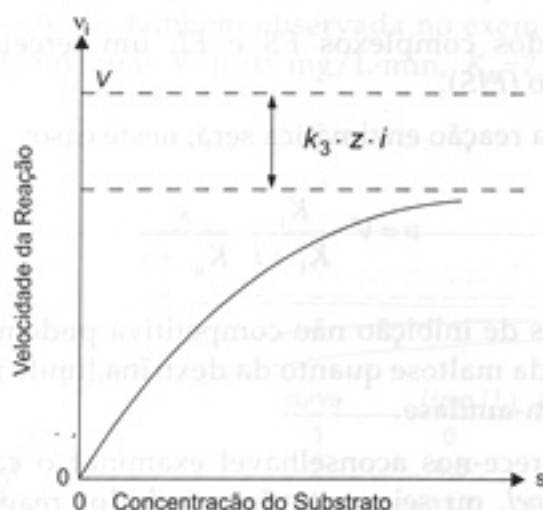


Figura 7.14 – Representação esquemática da influência da concentração do substrato na velocidade da reação na presença de um inibidor não-competitivo, que reage irreversivelmente com a enzima.

A aplicação do método de Lineaver-Burk à eq. (7.20) nos dá:

$$\frac{1}{v_i} = \frac{1}{V - k_3 \cdot z \cdot i} + \frac{K_m}{V - k_3 \cdot z \cdot i} \cdot \frac{1}{s} \quad (7.21)$$

esquematicamente representada na Fig. 7.15.

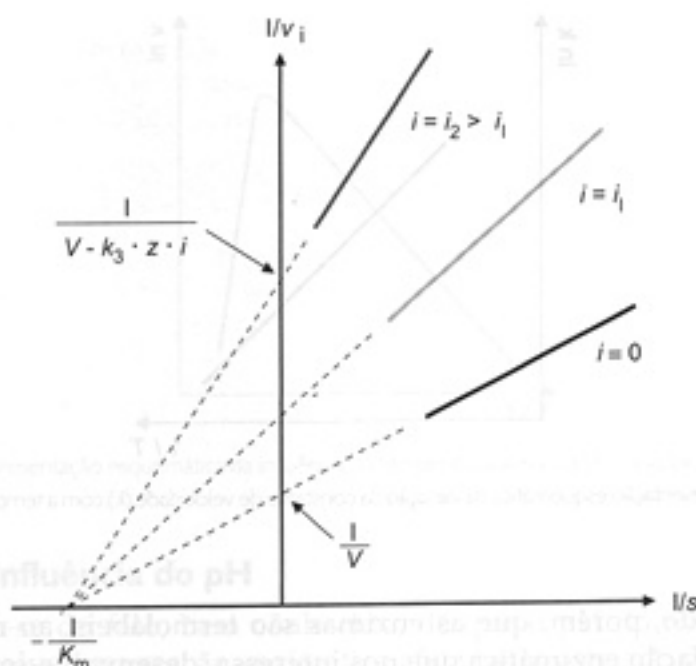


Figura 7.15 – Representação esquemática da aplicação do método de Lineweaver-Burk ao caso da inibição não-competitiva, em que o inibidor bloqueia irreversivelmente parte da enzima.

As eqs. (7.13) e (7.16) nos mostram ainda que, enquanto na inibição competitiva a velocidade máxima não é afetada e a constante de Michaelis é multiplicada por um fator maior que 1, na inibição não-competitiva a constante de Michaelis não é afetada e a velocidade máxima é menor do que V .

7.5 – Influência da temperatura

Na reação enzimática



a constante de velocidade k , dentro de certos limites, é função crescente da temperatura do sistema.

A experiência mostra que a influência da temperatura na constante de velocidade k obedece à lei de Arrhenius, representada pela eq. (7.22) e pela Fig. 7.16:

$$k = k_0 \cdot e^{-\alpha/RT} \quad (7.22)$$

onde α é a energia de ativação, R é a constante dos gases perfeitos e T é a temperatura absoluta do sistema.

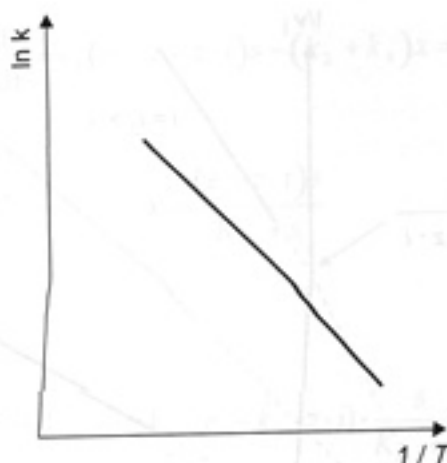
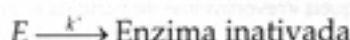


Figura 7.16 – Representação esquemática da variação da constante de velocidade (k) com a temperatura absoluta (T).

Lembrando, porém, que as enzimas são termolábeis, ao mesmo tempo que ocorre a reação enzimática que nos interessa, desenvolve-se também a reação de inativação térmica da enzima que atua no sistema:



e a constante de velocidade desta reação (k') também é afetada pela temperatura de acordo com a lei de Arrhenius:

$$k' = k'_0 \cdot e^{-\beta/RT} \quad (7.23)$$

sendo β a correspondente energia de ativação.

A experiência mostra que, enquanto o valor de α se situa no intervalo 4 a 20 kcal/mol, o de β é consideravelmente maior, atingindo 40 a 200 kcal/mol.

Levando em conta esses fatos, suponhamos uma dada reação enzimática com $\alpha=12$ kcal/mol e $\beta=120$ kcal/mol, desenvolvendo-se a 20°C e a 30°C. Tanto o valor de k quanto o de k' aumentam quando a temperatura passa de 20°C a 30°C, e as eqs. (7.22) e (7.23) permitem calcular esses aumentos: enquanto k (constante de velocidade de formação do produto) se torna aproximadamente 2 vezes maior, k' (constante de velocidade de inativação térmica da enzima) se torna cerca de 860 vezes maior. Compreende-se, assim, por que motivo a elevação da temperatura acima de um certo valor acarretará, devido às altas velocidades de inativação térmica da enzima, diminuição da velocidade de formação do produto. Gráficos como o da Fig. 7.17 representam esse fenômeno.

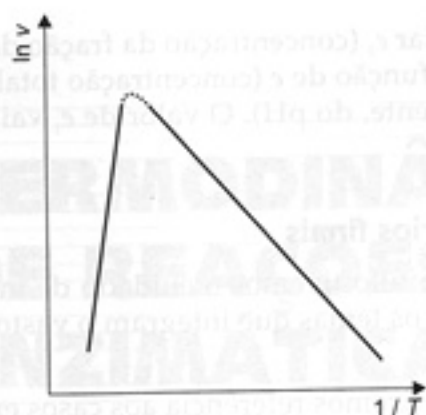


Figura 7.17 – Representação esquemática da influência da temperatura absoluta (T) na velocidade de formação do produto (v).

7.6 – Influência do pH

Partindo-se do fato, bem conhecido, de que o pH do meio aquoso em que se desenvolve uma reação enzimática afeta tanto o estado de ionização da enzima quanto a velocidade da reação, pode-se supor que a atividade catalítica da enzima depende de seu estado de ionização.

Imaginemos, então, o seguinte sistema relativamente simples:

- 1) A enzima se encontra em três estados de ionização, representados por $E^{(0)}$, $E^{(-1)}$ e $E^{(-2)}$;
- 2) Somente $E^{(-1)}$ apresenta atividade catalítica;
- 3) Os seguintes equilíbrios coexistem no sistema



e as respectivas constantes de equilíbrio são K_1 e K_2 ;

- 4) As molaridades de $E^{(0)}$, $E^{(-1)}$, $E^{(-2)}$ e H^+ são, respectivamente, e_0 , e_1 , e_2 e h ;
- 5) A molaridade total da enzima presente no sistema é e ,

Podemos, então, escrever:

$$K_1 = \frac{h \cdot e_1}{e_0} \quad (7.24)$$

$$K_2 = \frac{h \cdot e_2}{e_1} \quad (7.25)$$

$$e = e_0 + e_1 + e_2 \quad (7.26)$$

que nos permitem calcular e_i (concentração da fração da enzima que apresenta atividade catalítica) em função de e (concentração total da enzima no sistema) e de h (e , conseqüentemente, do pH). O valor de e_i vai determinar a velocidade v na eq. (7.5).

7.7 – Comentários finais

No início deste capítulo tivemos o cuidado de informar que não seriam examinados, aqui, todos os temas que integram o vasto campo da cinética dos processos enzimáticos.

Em particular, não fizemos referência aos casos em que se utilizam enzimas imobilizadas, cuja importância vem crescendo consideravelmente. Esse assunto será examinado nos Volumes 2 e 3 desta coleção.

Outro tópico que, por seu potencial interesse prático vem merecendo atenção crescente, é o da ação catalítica de enzimas em meios não-aquosos.

A Literatura que indicamos a seguir poderá ser consultada para um primeiro aprofundamento dos estudos.

Literatura recomendada

- (1) BAILEY, J. E. & OLLIS, D. F. **Biochemical Engineering Fundamentals**, McGraw-Hill, N. York (1986).
- (2) DIXON, M. & WEBB, E. C. **Enzymes**, 3.^a Edição, Academic Press, N. York (1979).
- (3) ILLANES, A. **Biología de Enzimas**. Ediciones Universitarias de Valparaíso de la Universidad Católica de Valparaíso, Valparaíso, (1994).
- (4) LAIDLER, K. J. & BUNTING, P. S. **The Chemical Kinetics of Enzyme Action**, 2.^a Edição, Clarendon Press, Oxford (1973).
- (5) SEGEL, I. H. **Enzyme Kinetics**. Wiley-Interscience, N. York (1975).

8

TERMODINÂMICA DE REAÇÕES ENZIMÁTICAS

Otto J. Crocomo e Luiz Carlos Basso

8.1 – Introdução

Hoje, mais do que nunca, estamos conscientes de que a *energia*, a capacidade de realizar trabalho, é vital para uma civilização moderna. Nas suas diversas formas (elétrica, mecânica, química, calorífica, luminosa etc.) é utilizada para a manufatura de produtos, transporte, aquecimento, refrigeração e demais trabalhos.

A célula viva igualmente necessita de energia para a realização dos diversos trabalhos fisiológicos que ela executa: biossínteses (trabalho químico), transporte ativo (trabalho osmótico), contração muscular (trabalho mecânico), bioluminescência etc.

A *bioenergética* é o campo da bioquímica que trata das transformações e uso da energia pelas células vivas, estando sujeita aos mesmos princípios da termodinâmica, mas as peculiaridades dos sistemas biológicos exigem uma abordagem diferenciada, como será apresentado no presente capítulo.

Em sentido amplo, as células fotossintetizadoras e as heterotróficas alimentam-se mutuamente. As primeiras aproveitam-se do CO_2 atmosférico para produzir carboidratos e devolver O_2 ao meio ambiente. As heterotróficas, por sua vez, utilizam os carboidratos assim produzidos e o O_2 e liberam CO_2 para a atmosfera. A Fig. 8.1 mostra essa interdependência nutricional (sintrofia) ressaltando-se o acoplamento dos ciclos do carbono e do oxigênio na biosfera: durante a fotossíntese, a energia solar é transformada em energia química sob a forma de ATP, NADPH e carboidratos (glicose), os quais são utilizados pelas células heterotróficas na realização de atividades que consomem energia. A luz solar é, em última análise, a primeira fonte de energia tanto para células autotróficas como heterotróficas.

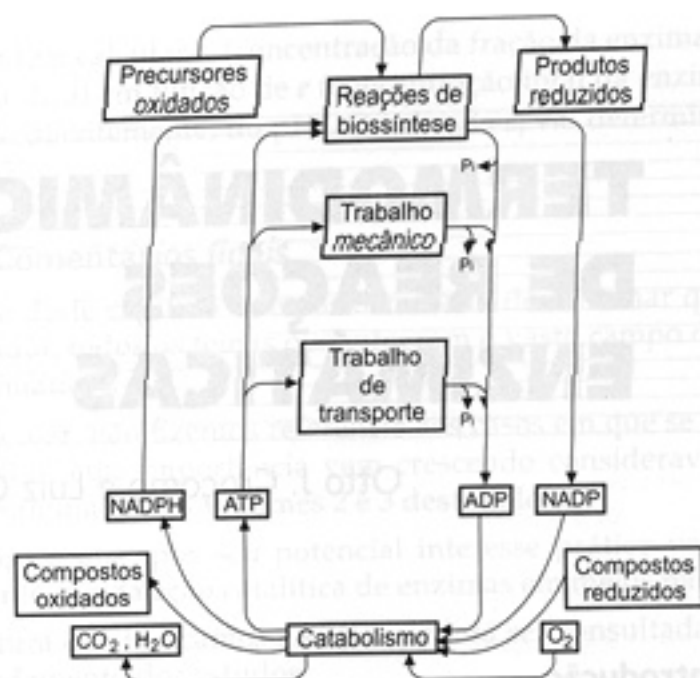


Figura 8.1 – O ciclo do ATP/ADP e a transferência de elétrons e hidrogênio através do sistema NADPH/NADP.

No ciclo biológico da energia e, portanto, no fluxo de energia na biosfera, estão comprometidas grandes quantidades de energia. Anualmente, as células fotossintetizadoras capturam cerca de 10^{21} cal de energia solar, e aproximadamente 33×10^9 t de carbono fluem através do ciclo do carbono na biosfera. Esse fluxo se processa durante o transcorrer do metabolismo, ou seja, durante as reações bioquímicas de degradação de substâncias complexas (catabolismo) e de síntese de compostos complexos (anabolismo). As primeiras reações são acompanhadas pela libertação de energia livre das estruturas complexas de grandes moléculas orgânicas, com a conservação dessa energia sob a forma de ligações ricas de energia do ATP. Por outro lado, nas sínteses enzimáticas de moléculas complexas (proteínas, ácidos nucleicos, polissacarídeos, lipídeos) a partir de precursores mais simples, ocorre aumento no tamanho e complexidade da molécula, levando a uma diminuição na entropia do sistema, exigindo o fornecimento de energia livre, proporcionada por ATP.

Tanto catabolismo como anabolismo consistem em dois processos simultâneos e interdependentes. Um deles — o *metabolismo intermediário* — é uma sequência de reações enzimáticas pela qual o esqueleto covalente de uma biomolécula é degradado ou sintetizado; seus intermediários químicos são chamados *metabólitos*. Cada reação química do metabolismo intermediário é acompanhada por uma variação no conteúdo de energia. Ou seja, em certos passos da sequência catabólica, pode ocorrer conservação de energia dos metabólitos — usualmente como ATP — e, em certos pontos das reações anabólicas, pode haver necessidade da introdução de energia. Esse processo é

chamado *acoplamento de energia*. O metabolismo intermediário e o acoplamento de energia são obrigatoriamente interconectados e interdependentes, fazendo com que, quando se estudam os processos metabólicos, sejam analisadas não somente as reações químicas que transformam a estrutura covalente do precursor no produto, mas também as variações de energia que acompanham essa conversão. É deste último aspecto que trataremos neste capítulo.

Moléculas orgânicas altamente organizadas, como glicose, possuem muito pouca entropia. Quando oxidadas por oxigênio molecular, elas se desorganizam, sofrendo seus átomos uma crescente *randomização*, separando-se uns dos outros. Como resultado, a molécula sofre uma perda de energia livre, a qual, sob condições de temperatura e pressão constantes, é utilizada para produzir trabalho químico.

As oxidações biológicas são combustões que ocorrem a baixas temperaturas. Ora, calor não pode ser usado como fonte de energia para os seres vivos (que são essencialmente isotérmicos), a menos que, sob pressão constante, seja levado de regiões mais quentes para mais frias. Nessas condições, o calor produzirá trabalho. Nas células, entretanto, a energia livre dos combustíveis é conservada como energia química das ligações fosfatadas de ATP. O ATP assim formado pode difundir-se para outros compartimentos dentro da célula onde sua energia é necessária e, desse modo, pode ser visualizado como uma forma de transporte de energia. A energia química de ATP é então libertada, quando seus grupos fosfato terminais são transferidos para aceptores específicos, os quais se tornam ricos de energia e podem produzir trabalho.

Um outro meio de transporte de energia que ocorre nas células é sob a forma de elétrons. Os elétrons são transportados enzimaticamente de reações oxidativas produtoras de elétrons para reações onde haja necessidade de redução de ligações duplas em ligações simples. Os coadjuutores dessa transferência são as coenzimas que transportam elétrons, sendo a mais importante o NADP (fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida-adenina). Do mesmo modo que ATP é o transportador de grupos fosfatos ricos de energia, NADP é o carregador de elétrons ricos de energia, transferindo-os de reações catabólicas para reações anabólicas que exigem elétrons.

8.2 – Princípios da Termodinâmica

Uma revisão dos princípios do equilíbrio termodinâmico é essencial para a compreensão do ciclo de energia da célula — e, portanto, da função do ATP — em bases físicoquímicas. O objetivo precípua da Termodinâmica é a energia em todas as suas manifestações, uma vez que todas as outras formas de energia, que não a calorífica, são convertidas em calor, e podem ter tido origem no calor. A Termodinâmica Química procura determinar o que torna realidade uma reação química e o que faz com que a mesma se complete, em termos das variações de energia com ela associadas. Se bem que energia

calorífica esteja envolvida, e que medidas termodinâmicas sejam medidas de variação de calor em um *sistema* que está sofrendo variação química, elas devem ser interpretadas em termos de uma redistribuição de seu conteúdo energético entre as várias formas nas quais essa energia está presente no *sistema*.

Um *sistema* é considerado um conjunto de matéria objeto de análise. Tudo o mais no universo que não faça parte desse sistema particular é o meio. Sistema e meio formam o *universo termodinâmico*. Nesse universo, energia pode passar do sistema para o meio e deste voltar ao sistema. Esse fluxo de energia é analisado termodinamicamente em termos do conteúdo energético do estado inicial do sistema + meio e o *estado final* após o equilíbrio ser atingido. Atributos mensuráveis, como temperatura, pressão, volume, massa e outros, são os responsáveis pelo conteúdo de energia em cada estado, o que é formulado por uma *equação de estado*. Ora, a Termodinâmica analisa as variações de energia considerando a matéria como um todo, ou seja, usa parâmetros macroscópicos e, portanto, não requer o conhecimento da composição molecular do sistema ou seu meio, ou do mecanismo molecular através do qual um processo tem lugar. A análise termodinâmica das variações de energia leva em conta somente os estados inicial e final do sistema e independe da intensidade com que os processos ocorrem, o que deve ser estudado por métodos cinéticos, um outro capítulo da Fisicoquímica.

Um sistema pode ser *isolado*, *fechado* ou *aberto*. Este último discutiremos posteriormente. Um sistema é *isolado* quando não troca matéria e energia com seu meio. É *fechado* quando não troca matéria com seu meio, mas energia é livremente trocada. A análise dos sistemas fechados é relativamente simples, porque só se consideram os estados inicial e final após o equilíbrio ter sido atingido. O estado de um sistema pode ser definido em termos de sua pressão, temperatura e composição. Quando pressão e temperatura são mantidas constantes, as variações de energia podem ser diretamente relacionadas com as trocas na composição material.

8.2.1 – Conservação de energia

A primeira lei da Termodinâmica estabelece que a "a energia total de um sistema isolado é constante, apesar de que, dentro desse sistema, possa ocorrer variação em sua forma". Ou seja, a energia não pode ser criada e nem destruída, mas ela pode sofrer transformação de uma para outra forma, como energia calorífica, luminosa, elétrica, mecânica e química. O princípio de conservação de energia engloba não só os sistemas isolados, mas também as trocas de energia que ocorrem entre um sistema fechado e seu meio, uma vez que um *sistema fechado + seu meio* formam um sistema isolado.

No caso de um processo químico, a primeira lei diz que, quando uma reação química ocorre, a diferença entre a energia potencial dos reagentes e a dos produtos resultará em energia que está sendo liberada ou absorvida. A quantidade de energia depende somente da natureza química dos reagentes e

dos produtos. Parte da energia pode ser liberada como calor e parte como trabalho, mas, para uma quantidade fixa do reagente, a soma do calor e do trabalho sempre será a mesma. Quantitativamente essas considerações podem ser expressas como

$$\Delta E = E_{\text{final}} - E_{\text{inicial}} \quad (8.1)$$

sendo ΔE a variação na energia quando o sistema vai do estado inicial para o final.

Um sistema fechado pode realizar vários tipos de trabalho sobre seu meio, cujas quantidades podem ser somadas sob o termo W (trabalho), quando então a energia total gasta pelo sistema para fazer o trabalho é $-W$. Ao mesmo tempo em que o sistema isotérmico, sob pressão (P) constante, perde energia intrínseca para seu meio ($-W$), ele também adquire energia sob a forma de calor ($+Q$) a partir de seu meio. Nesse caso, a variação em sua energia intrínseca será o resultado da soma da aquisição de energia Q e perda de energia $-W$:

$$\Delta E = Q - W \quad (8.2)$$

onde W é o trabalho feito pelo sistema e Q o calor absorvido pelo sistema. O sinal $-$ indica que o trabalho feito pelo sistema envolve gasto de energia, enquanto o sinal $+$ indica que o calor absorvido pelo sistema representa ganho de energia.

A energia pode ser transferida de um sistema para outro, seja por meio de fluxo de calor ou por meio de trabalho. É importante ter em mente que a energia (E) é uma propriedade característica de um sistema. Fluxo de trabalho e calor não são propriedades de um sistema, mas constituem meios pelos quais a energia é transferida quando ocorre a troca.

Apesar da existência de muitos tipos de trabalho, em Química os mais significativos são o trabalho elétrico e o realizado pelos gases em expansão. Trabalho elétrico pode ser produzido por células eletroquímicas, enquanto que trabalho em expansão resulta de uma variação no volume dos sistemas envolvidos e é usualmente chamado de trabalho pressão-volume (trabalho PV).

Para qualquer sistema isotérmico fechado que não realiza outro trabalho sobre seu meio senão aquele que deriva de sua expansão, temos:

a) volume constante,

$$\Delta E = Q_v \text{ (não pode se expandir);} \quad (8.3)$$

b) pressão constante,

$$\Delta E = Q_p - P \cdot \Delta V \quad (8.4)$$

Q_v é o calor absorvido sob volume constante, quando nenhum trabalho é realizado; Q_p o calor absorvido sob pressão constante, quando nenhum trabalho é realizado além do trabalho pressão-volume de expansão; $P \cdot \Delta V$ o trabalho pressão-volume realizado pelo sistema sobre seu meio como consequência da expansão; e ΔE o aumento na energia intrínseca.

Considerando-se também todas as outras formas de trabalho (W'), a primeira lei pode ser assim escrita:

$$\Delta E = Q - P \cdot \Delta V - W' \quad (8.5)$$

Entretanto, se $W' = 0$,

$$\Delta E = Q - P \cdot \Delta V \quad (8.6)$$

Essa expressão da primeira lei é a mais útil aos químicos.

8.2.2 – Entalpia

A energia intrínseca (E) de um sistema é um atributo que depende do estado presente do sistema; é uma função de estado. Não se pode medir o valor de E de um sistema fechado em um estado qualquer, mas é possível medir-se a diferença entre os valores que E adquire em dois estados, obtendo-se ΔE . Isso porque, sob T e P constantes, $\Delta E = Q - W$. As vias pelas quais essa variação tem lugar podem ser várias e, em cada uma delas, Q e W têm valores únicos.

Sob pressão constante, o valor de Q pode ser calculado a partir da equação

$$Q_p = \Delta E + W \quad (8.7)$$

e, então,

$$Q_p = \Delta E + P \cdot \Delta V \quad (8.8)$$

Como a energia vai de um estado 1 para um estado 2, a Eq. (8.8) pode ser assim reescrita:

$$Q_p = (E_2 - E_1) + (PV_2 - PV_1) \quad (8.9)$$

que nos dá

$$Q_p = (E_2 + PV_2) - (E_1 + PV_1) \quad (8.10)$$

Desse modo, o calor associado com um processo que ocorre sob pressão constante pode ser obtido pela diferença entre dois termos $E + PV$.

Ora, Q_p é uma função de estado e, portanto, pode ser expressa como a diferença dos valores de uma propriedade de estado entre os estados inicial e final. É o que indica a Eq. (8.10). A função $E + PV$ recebe o símbolo H , e é chamada de *conteúdo total de calor* ou *entalpia* do sistema. Para um dado processo que se desenvolve sob pressão constante, o calor liberado ou absorvido é dado pelo termo ΔH , que é variação na entalpia do sistema durante o processo:

$$\Delta H = Q_p = H_2 - H_1; \quad (8.11)$$

H é uma função de estado e pode ser expressa em termos de E , P e V , sendo cada um deles também uma função de estado.

Se, sob condição de P constante, calor é liberado no meio, o sistema deve decrescer em entalpia (ΔH será negativo); a reação química é chamada exotérmica. Se calor é absorvido pelo sistema, há um aumento na entalpia (ΔH será positivo) e a reação química é chamada de endotérmica.

8.2.3 – Energia Livre

Algumas limitações quanto ao tipo de transformações de energia que ocorrem em processos químicos ou físicos são colocadas pela segunda lei da Termodinâmica, a qual prediz em que direção um dado processo provavelmente se dá. Essa lei estabelece que “reações espontâneas são aquelas que, quando realizadas sob condições apropriadas, podem realizar trabalho útil”. Esse trabalho útil é expresso pelo termo energia livre (G) sugerido por Gibbs, que é o potencial máximo do sistema que está sob T e P constantes. A variação no valor de G é simbolizada como ΔG .

Geralmente se supõe que, quando um sistema sob P e T constantes perde calor para seu meio, ele também deva estar sofrendo uma transformação espontânea. Se esse fosse o caso, todas as reações exotérmicas seriam espontâneas. Por outro lado, supõe-se também que as reações endotérmicas não ocorram espontaneamente. Na realidade, nenhuma dessas suposições é correta, pois a variação de calor que acompanha uma reação, sob P e T constantes, ou seja, ΔH , não é, em si mesma, uma medida real da capacidade de uma reação produzir trabalho útil. É o sinal de ΔG que indica se uma reação é capaz de realizar outro trabalho além do trabalho PV . Se for *negativo*, o sistema terá *perdido* energia livre, a qual pode ter sido utilizada para realização de trabalho. Se for *positivo*, o sistema terá *recebido* energia livre, e a reação não pode realizar trabalho. No primeiro caso, a reação é chamada de *exergônica* e, no segundo caso, de reação *endergônica*. A segunda lei, portanto, diz que uma reação espontânea é caracterizada pela perda de energia livre. Ela também prediz que uma reação tomará uma determinada direção, porém, não prediz com que velocidade a mesma se dará. Portanto, uma reação isotérmica pode ser

exotérmica: ΔH é negativo; exergônica: ΔG é negativo;
 endotérmica: ΔH é positivo; endergônica: ΔG é positivo;
 Assim, as reações espontâneas são, obrigatoriamente, exergônicas.

8.2.4. Entropia

Uma reação exergônica não é necessariamente exotérmica, mas é espontânea sob T e P constantes. Logo, a quantidade de calor absorvida ou gerada por uma reação, quando não está realizando trabalho útil (ou seja, ΔH), geralmente difere do valor ΔG . Essa diferença frequentemente é tão grande que torna ΔH sem valor como um índice de espontaneidade da reação. Ainda mais, deve ocorrer uma outra variação na distribuição da energia a qual não está implicada na variação da energia livre. A diferença entre os valores de H e G , de fato, pode ser atribuída a uma variação simultânea no valor de uma outra função de estado do sistema, a entropia.

A terceira lei da Termodinâmica estabelece que "no zero absoluto, os cristais perfeitos de todos os compostos têm entropia nula". Ou seja, quanto mais ordenado for o sistema, menor será sua entropia (S). Aliás, entropia é uma medida da desorganização de um sistema. É um valor que determina qual a porção da energia de um sistema que é incapaz de produzir trabalho útil.

Sob uma dada T e P , a variação na entropia S é igual à soma das entropias dos produtos menos a soma das entropias dos reagentes. Numa reação isotérmica, ΔH difere de ΔG por uma quantidade relacionada a ΔS :

$$\Delta G = \Delta H - T \cdot \Delta S \quad (8.12)$$

Na realidade, entropia é uma função matemática de várias variáveis, como temperatura e pressão, e é expressa em unidades de entropia, sendo que 1 u.e. = 1 cal.grau⁻¹.mol⁻¹. Sob uma dada temperatura, os gases possuem alta entropia, os líquidos entropia intermediária e os sólidos baixa entropia.

Todo processo tende para a direção em que a entropia do sistema + meio aumenta, até que o equilíbrio é atingido, no qual a entropia tem o máximo valor que pode possuir sob as condições de pressão e temperatura do momento. Equilíbrio pode ser definido como um estado além do qual nenhuma variação química ou física tem lugar e no qual temperatura, pressão e concentração permanecem constantes em todo o sistema. Aliás, um sistema em equilíbrio exauriu sua capacidade de produzir trabalho sobre seu meio. Desde que um processo ocorre com aumento em entropia e atingiu o equilíbrio, ele não pode mais sofrer uma reversão espontânea e voltar a seu estado inicial, pois isso exigiria um decréscimo na entropia. Todo processo que se dá com aumento na entropia é chamado *irreversível*, enquanto que os processos que se dão sem variação na entropia são chamados *reversíveis*. Em nosso mundo físico, todos os processos reais, incluindo a vida, são *irreversíveis*.

Desse modo, em todos os processos, sejam físicos ou químicos, ocorrendo portanto no sentido de se aumentar a entropia, parte da energia "útil" (aquela capaz de realizar trabalho) é "degradada" para uma forma de energia "inútil", incapaz de produzir trabalho.

8.2.5 – Implicações biológicas

Da Eq. (8.12) e da Eq. (8.13), a qual define entalpia, podem-se extrair certas implicações biológicas:

$$\Delta H = \Delta E + \Delta PV \quad (8.13)$$

As reações químicas dos sistemas biológicos têm lugar em soluções aquosas diluídas sob temperatura, pressão e volume constantes. Quando se cria uma condição na qual ΔPV torna-se zero, então ΔH será igual a ΔE . Nesse caso, pode-se substituir o valor de ΔH na Eq. (8.12) por ΔG (Eq. 8.14).

$$\Delta G = \Delta E - T \cdot \Delta S \quad (8.14)$$

Essa equação pode ser então transformada em

$$\Delta E = \Delta G + T \cdot \Delta S \quad (8.15)$$

Desse modo, sob T e P constantes, a variação na energia total do sistema ΔE , equivalente à variação no calor, é a soma dos termos $T \cdot \Delta S$ e a variação na energia livre ΔG . À medida que o sistema se aproxima do equilíbrio, a energia livre decresce para o mínimo.

Ora, sob condições de temperatura e pressão constantes no sistema, este troca livremente energia com o meio, não ocorrendo, entretanto, troca na massa. Quando um sistema sofre variação que leva a um equilíbrio, a energia total do sistema + meio permanece constante, apesar de a energia total do sistema sozinho crescer, ficar constante ou decrescer. Ao mesmo tempo, o sistema pode ceder calor para o meio, ou receber calor do meio. Já se sabe, por outro lado, que, durante um processo, a entropia do sistema + meio aumenta até alcançar um máximo no ponto de equilíbrio. A força que realmente dirige qualquer processo é a tendência para aumentar a entropia no universo.

A entropia *só do sistema* não necessariamente aumenta durante um processo que se dirige para um equilíbrio. Seu valor pode aumentar, ficar constante ou decrescer. Se ela *decresce*, então a entropia *do meio* deverá *aumentar* uma quantidade tal que faça com que a soma das variações da entropia do sistema e do meio aumente. É o que acontece quando os organismos vivos crescem: a entropia do organismo (sistema) decresce enquanto a do meio aumenta.

A vida, já definida filosoficamente como sendo um conjunto de princípios que resiste à morte, caracteriza-se pela busca e manutenção de estados alta-

mente organizados. Tal organização, seja de moléculas, organelas, células ou tecidos, como formas vivas mais complexas, é atingida às custas da energia obtida do meio. A vida, pois, pode ser entendida como um processo que "luta" contra a entropia, a desorganização, o caos inexorável.

8.2.6. Variação-padrão de energia livre

Consideremos uma reação química bimolecular:



Nessa equação, a , b , c e d são os números das moléculas de A , B , C e D , substâncias químicas que participam da reação. A constante de equilíbrio K' para a Eq. (8.16) é:

$$K' = \frac{[C]^c [D]^d}{[A]^a [B]^b} \quad (8.17)$$

A partir do conhecimento do valor de K' , o valor da variação da energia livre é dado pela expressão

$$\Delta G = \Delta G^\circ + RT \ln K' \quad (8.18)$$

onde ΔG° é a *variação-padrão de energia livre*. Seu valor é obtido quando a reação se processa à temperatura de 25°C, e todos os componentes da reação estão em seu estado-padrão. O estado-padrão é uma condição de referência conveniente na qual as atividades são arbitrariamente definidas como unidade para líquidos e sólidos puros, gases a 1 atm e compostos em solução em concentração aproximadamente 1M. Segue-se, portanto, que ΔG° é uma constante para uma dada reação.

Deve-se ter em mente que é o valor de ΔG e não o de ΔG° que indicará se uma reação é espontânea ou não. Entretanto, as tabelas que se encontram nos textos sempre incluem os valores de ΔG° , porque são quantidades definidas, enquanto que ΔG pode ter qualquer valor, dependendo das condições implicadas na Eq. (8.17) que, obviamente, reflete-se na Eq. (8.18).

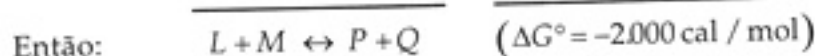
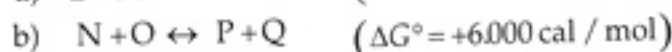
Quando uma reação atinge o equilíbrio, $\Delta G = 0$. Nesse ponto, a energia livre é mínima e não há possibilidade de posteriores transformações. Obtém-se então

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K' \quad (8.19)$$

ou então,

$$\Delta G^\circ = -2,303RT \log K' \quad (8.20)$$

Na realidade, os valores de ΔG° são aditivos, ou seja, a variação-padrão de energia livre de uma reação é a diferença entre a energia-padrão dos reagentes e a energia-padrão dos produtos:



Quando as medidas de variação de energia livre de uma reação são feitas em outras temperaturas que não 25°C , o valor de ΔG° deve ser seguido da indicação da temperatura. Da mesma forma, o valor de ΔG° é modificado quando as reações envolvem diferentes valores pH. A variação-padrão de energia livre a pH 7,0 é designada como ΔG° .

A Eq. (8.20) possibilita o cálculo de ΔG de qualquer reação, a uma dada temperatura, a partir de sua constante de equilíbrio, a qual é determinada por métodos analíticos. Se $K' = 1,0$, então $\Delta G^\circ = 0,0$ e não ocorre qualquer variação na energia livre quando 1 mol dos reagentes é completamente convertido nos produtos, sendo que todos os componentes estão na concentração 1,0 M. Se K' for maior do que 1,0, então ΔG° será negativo. Se K' for menor do que 1,0, ΔG° será positivo. Têm-se assim, as reações exergônicas e endergônicas, respectivamente. A Tab. 1 mostra uma relação entre os valores de ΔG° e a grandeza da constante de equilíbrio.

Tabela 8.1 - Relação entre os valores de ΔG° e a constante de equilíbrio a 25°C

ΔG° (cal)	K'
+ 4089	0,001
+ 2726	0,01
+ 1363	0,1
0	1
-1363	10
- 2726	100
- 4089	1000

Os valores da Tab. 8.1 foram obtidos considerando-se que, em uma célula viva, o equilíbrio é atingido, porém reagentes e produtos são mantidos dentro de estreitos limites, em níveis de regime estacionário, que podem ser

bastante diferentes dos níveis de equilíbrio. Entretanto a energia liberada ou utilizada em uma reação depende da magnitude com que o sistema se desvia do equilíbrio. Na realidade, uma expressão matemática de ΔG de uma reação deve, então, conter dois termos: um indicando as concentrações atuais dos reagentes e produtos e outro indicando as concentrações no equilíbrio. Assim, para a reação



temos

$$\Delta G = -RT \ln K' + RT \ln \frac{[C]^c [D]^d}{[A]^a [B]^b} \quad (8.21)$$

$$\Delta G = -2,3RT \log K' + 2,3RT \log \frac{[C]^c [D]^d}{[A]^a [B]^b} \quad (8.22)$$

que, a 25°C, nos leva a

$$\Delta G = -1363 \log K' + 1363 \log \frac{[C]^c [D]^d}{[A]^a [B]^b} \quad (8.23)$$

No equilíbrio, a relação entre a concentração dos produtos e a dos reagentes é igual a K' e, portanto, $\Delta G = 0$.

Logo:

$$\Delta G^\circ = -1363 \log K' \quad (8.24)$$

Desse modo, o valor de ΔG° está relacionado com K' .

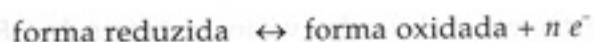
A Tab. 8.2 mostra uma relação de valores de ΔG° de algumas reações de importância biológica, calculados a partir de medidas de equilíbrio e dos valores de energia livre de formação. O ΔG° de uma reação química é igual à diferença entre a soma das energias livres-padrão de formação dos produtos e a soma das dos reagentes, levando-se em conta a estequiometria da reação. Observe-se que, na Tab. 8.2 estão indicados dois tipos de reações, que se dão com decréscimo especialmente grande na energia livre de hidrólise: a hidrólise de anidridos (anidrido acético pirofosfato) e reações de oxidação. Essas reações são de grande significado bioquímico nas transformações de energia na célula.

Tabela 8.2 – Valores da variação na energia livre-padrão de algumas reações químicas

REAÇÃO	ΔG° (kcal em pH 7,0 e 25°C)
Oxidação	
glicose + 6O ₂ → 6CO ₂ + 6H ₂ O	- 686
Palmitato + 23O ₂ → 16CO ₂ + 16H ₂ O	- 2338
Hidrólise	
anidrido acético + H ₂ O → 2 acetato	- 21,8
pirofosfato + H ₂ O → 2 fosfato	- 8,0
glicose-6-fosfato + H ₂ O → glicose + fosfato	- 3,3
glutamina + H ₂ O → glutamato + NH ₄ ⁺	- 3,4
sacarose + H ₂ O → glicose + frutose	- 7,0
Reagrupamento	
glicose-1-fosfato → glicose-6-fosfato	- 1,7
frutose-6-fosfato → glicose-6-fosfato	- 0,4
Eliminação	
malato → fumarato + H ₂ O	+ 0,75

8.2.7 – Potencial de oxirredução

Oxidação é a perda de elétrons e redução é o ganho de elétrons, sendo ambos os processos complementares. Um sistema de oxirredução (OR) típico pode ser escrito



onde n é o número de elétrons (e) envolvidos na reação. Se um eletrodo de metal inerte (platina ou prata) é imerso em uma solução de um sistema OR, estabelece-se uma diferença de potencial entre os elétrons na solução e os no metal. Essa condição dá nascimento a um potencial de eletrodo (E), cujo valor é assim calculado:

$$E = E^\circ + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[ox]}{[red]}$$

E° é a constante especial para um dado sistema conhecida como *potencial de eletrodo-padrão* (ou *fem-padrão*); R a constante dos gases ($= 8,314 \text{ J/mol.K}$); T a temperatura absoluta; n o número de equivalentes envolvidos na reação; F Faraday ($= 96.494 \text{ C}$) necessário para converter 1 equivalente de um elemento em 1 equivalente de íons; e *ox* e *red* são concentrações das formas oxidada e reduzida do sistema *OR*.

Um eletrodo imerso em uma solução de um sistema *OR* forma o que se conhece como *semicélula*, cuja diferença de potencial é impossível medir, já que ele é um eletrodo simples. Para medi-la, deve-se combiná-lo com outra *semicélula*, formando então uma célula completa. A diferença de potencial entre ambas as *semicélulas* é medida conectando-as por meio de um potenciômetro. Para se determinar o potencial de eletrodo de um composto, usa-se o eletrodo de hidrogênio como padrão de referência, cujo potencial é arbitrariamente tomado como zero. Porém não há necessidade de se fazer uso do eletrodo de hidrogênio em qualquer medida; basta que se use um eletrodo de construção mais fácil, como o de calomelano, cuja diferença de potencial foi acuradamente determinada em relação à *semicélula* de hidrogênio. Consequentemente, surge um novo símbolo E_h , onde o índice h indica que o eletrodo de comparação foi aferido em relação ao eletrodo de hidrogênio.

$$E_h = E - E_H$$

onde E_H é o potencial de eletrodo do hidrogênio que, por definição, é zero. Portanto a equação geral para o cálculo do potencial de um sistema *OR* é

$$E_h = E^\circ + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[ox]}{[red]}$$

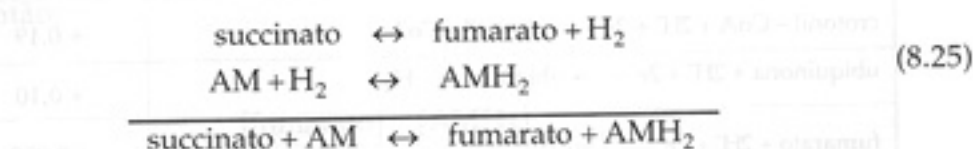
O valor E_h aumentará ou será mais positivo se a proporção (ox)/(red) aumentar e diminuirá, ou será mais negativo (ou menos positivo), se a forma reduzida for maior que a oxidada. Quando $ox/red = 1$, $E_h = E^\circ$. Conhecendo-se o valor E° , pode-se calcular o potencial de eletrodo do sistema em qualquer grau de oxidação ou redução. Por outro lado, o grau de oxidação pode ser obtido medindo-se o potencial de eletrodo.

Na Tab. 8.3 estão exemplificados vários sistemas de *OR* biológicos. Qualquer sistema será capaz de ser oxidado por um sistema mais positivo, isto é, situado acima dele na escala, e, por sua vez, oxidará qualquer sistema mais negativo que ele e, portanto, situado abaixo dele na escala. Não se deve esquecer que um catalisador pode ser necessário a fim de determinar a reação entre ambos os sistemas. Em uma reação enzimática, da formação do complexo enzima-substrato (*ES*) resulta a necessidade de menor quantidade de energia de ativação, ou seja, a combinação da enzima com o substrato determina uma diminuição na energia de ativação deste último.

Note-se que E° refere-se a medidas feitas no valor pH zero, o que frequentemente é impossível. Usa-se o termo E , para indicar que o potencial de eletrodo-padrão foi estabelecido a um dado valor do pH.

8.2.8 – Energia livre das reações de oxirredução

Consideremos uma mistura de dois diferentes sistemas OR, no mesmo pH, porém com potenciais diferentes. Entre ambos ocorrerá uma reação, a qual, em um dado momento, atingirá o equilíbrio, ou seja, os dois sistemas alcançaram o mesmo potencial. Como exemplo, tomemos o caso do sistema desidrogenase succínica/azul-de-metileno, processando-se a reação, por exemplo, no tubo de Thumberg:



sendo AM azul-de-metileno e AMH_2 azul-de-metileno reduzido (leucobase). A constante de equilíbrio será

$$K' = \frac{[\text{fumarato}] [\text{AMH}_2]}{[\text{succinato}] [\text{AM}]}$$

Quando as soluções são misturadas, o sistema succinato/fumarato, tendo potencial mais baixo, reduz o sistema azul-de-metileno e se oxida. Consequentemente, a relação fumarato/succinato aumenta e a relação AM/ AMH_2 diminui, determinando um aumento no potencial do primeiro sistema e um decréscimo no potencial do último, até que o equilíbrio é alcançado, quando então ambos os sistemas terão o mesmo potencial ($E_{h1} = E_{h2}$). A temperatura é de 30°C e $n = 2$.

$$E'_{o \text{ (fum-succ)}} + 0,03 \cdot \log \frac{[\text{fumarato}]}{[\text{succinato}]} = E'_{o \text{ (AM-AMH}_2)} + 0,03 \cdot \log \frac{[\text{AM}]}{[\text{AMH}_2]}$$

$$\Delta E'_o = 0,011 - 0,005 = 0,03 \cdot \log \frac{[\text{fumarato}] [\text{AMH}_2]}{[\text{succinato}] [\text{AM}]}, \quad (8.27)$$

$$0,006 = 0,03 \cdot \log \frac{[\text{fumarato}] [\text{AMH}_2]}{[\text{succinato}] [\text{AM}]} \quad (8.28)$$

Tabela 8.3 – Potenciais de oxirredução de algumas reações bioquímicas*

REAÇÃO (escrita na forma de redução)	E : pH 7,0 (V)
$\frac{1}{2} \text{O}_2 + 2\text{H}^+ + 2\text{e} \longrightarrow \text{H}_2\text{O}$	+ 0,816
$\text{Fe}^{+3} + \text{e} \longrightarrow \text{Fe}^{+2}$	+ 0,771
$\frac{1}{2} \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} + 2\text{e} \longrightarrow \text{H}_2\text{O}_2$	+ 0,30
citocromo a - $\text{Fe}^{+3} + 1\text{e} \longrightarrow$ citocromo a - Fe^{+2}	+ 0,29
citocromo c - $\text{Fe}^{+3} + 1\text{e} \longrightarrow$ citocromo c - Fe^{+2}	+ 0,25
crotonil - CoA + $2\text{H}^+ + 2\text{e} \longrightarrow$ butiril - CoA	+ 0,19
ubiquinona + $2\text{H}^+ + 2\text{e} \longrightarrow$ ubiquinona - H_2	+ 0,10
fumarato + $2\text{H}^+ + 2\text{e} \longrightarrow$ succinato	+ 0,030
$\text{FAD} + 2\text{H}^+ + 2\text{e} \longrightarrow \text{FADH}_2$	- 0,06
oxaloacetato + $2\text{H}^+ + 2\text{e} \longrightarrow$ malato	- 0,102
α - cetoglutarato + $\text{NH}_3 + 2\text{H}^+ + 2\text{e} \longrightarrow$ glutamato + H_2O	- 0,14
acetaldeído + $2\text{H}^+ + 2\text{e} \longrightarrow$ etanol	- 0,163
piruvato + $2\text{H}^+ + 2\text{e} \longrightarrow$ lactato	- 0,190
$\text{NAD}^+ + 2\text{H}^+ + 2\text{e} \longrightarrow \text{NADH} + \text{H}^+$	- 0,320
$\text{NADP}^+ + 2\text{H}^+ + 2\text{e} \longrightarrow \text{NADPH} + \text{H}^+$	- 0,320
piruvato + $\text{CO}_2 + 2\text{H}^+ + 2\text{e} \longrightarrow$ malato	- 0,33
acetil - CoA + $2\text{H}^+ + 2\text{e} \longrightarrow$ acetaldeído + CoA	- 0,41
$\text{CO}_2 + 2\text{H}^+ + 2\text{e} \longrightarrow$ formato	- 0,420
$\text{H}^+ + 1\text{e} \longrightarrow \frac{1}{2}\text{H}_2$	- 0,420
ferredoxina - $\text{Fe}^{+3} + 1\text{e} \longrightarrow$ ferredoxina - Fe^{+2}	- 0,432
acetato + $2\text{H}^+ + 2\text{e} \longrightarrow$ acetaldeído	- 0,60
acetato + $\text{CO}_2 + 2\text{H}^+ + 2\text{e} \longrightarrow$ piruvato	- 0,70

* Atividade unitária de todos os componentes, exceto H que é mantido em concentração 10^{-7} M . Os gases, a 1 atm de pressão.

Como as concentrações iniciais dos quatro componentes foram iguais, temos

$$0,006 = 2,0,03 \cdot \log \frac{[\text{fumarato}]}{[\text{succinato}]},$$

$$\log \frac{[\text{fumarato}]}{[\text{succinato}]} = 0,10$$

e então:

$$\frac{[\text{fumarato}]}{[\text{succinato}]} = \frac{[\text{AMH}_2]}{[\text{AM}]} = 1,26$$

Fazendo-se $x = \% \text{ de AMH}_2$, temos

$$\frac{x}{100 - x} = 1,26$$

$$x = 55,8\%$$

Logo, no equilíbrio, 55,8% do corante estarão na forma reduzida. No caso discutido, temos

$$\Delta E' = \frac{RT}{nF} \ln K'$$

de onde se segue que

$$nF \cdot \Delta E' = RT \ln K' \quad (8.26)$$

Ora, a partir dos conceitos de Termodinâmica, sabe-se que ΔG° está relacionada com K' :

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K' \quad (8.27)$$

Segue-se portanto, que

$$\Delta G^\circ = nF \cdot \Delta E'_0 \quad (8.28)$$

Isso significa que a variação-padrão de energia livre de uma reação entre dois sistemas OR pode ser calculada a partir da diferença entre os valores $\Delta E'$. De maneira semelhante, pode-se calcular a variação de energia livre para sistemas individuais e, desses dados, calcular-se a variação na energia livre dos sistemas combinados:

$$\Delta G^\circ = \Delta G_1^\circ - \Delta G_2^\circ$$

Na Eq. (8.28) o valor de $\Delta E'$ deve ser positivo, a fim de se obter ΔG negativo, ou seja, um valor $\Delta E'$ positivo indica uma reação espontânea.

O potencial de redução de uma meia-reação, na qual as formas oxidada e reduzida da substância estão presentes em concentrações não-padrão, pode ser calculado a partir da equação de Nernst:

$$E = E' + \frac{2,3RT}{nF} \log \frac{[\text{oxidada}]}{[\text{reduzida}]}$$

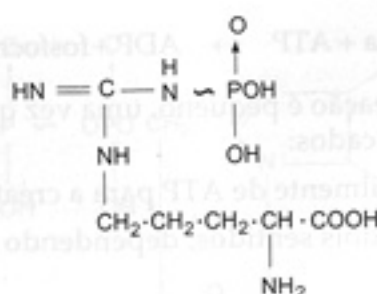
A 30°C, o termo $2,3RT/F = 0,06$ V e, portanto,

$$E = E' + \frac{0,06}{n} \log \frac{[\text{oxidada}]}{[\text{reduzida}]}$$

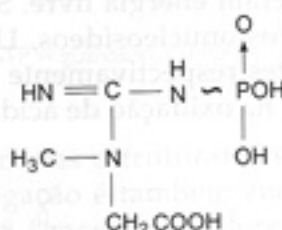
8.3 – Os níveis de energia livre

Em 1927, Eggleton & Eggleton e, pouco depois, Fiske & Subbarow isolaram creatina do músculo; essa substância se apresenta fosforilada e, tal como a do fosfato de arginina que também se encontra nos músculos, tem uma elevada energia de hidrólise (Fig. 8.2). Isso significa que, quando a ligação fosfatada se rompe, liberta energia livre de alto nível que é utilizada para o processo de contração muscular.

Lundsgaard, em 1930, observou que o músculo envenenado por iodoacetato ainda era capaz de contração. O tipo de inibição por iodoacetato já foi estudado. Ainda mais, nessas mesmas condições, o fosfato de creatina desaparecia no meio. Deveria haver, portanto, uma outra fonte de energia capaz de realizar aquela ação. Supôs-se que essa fonte fosse o trifosfato de adenosina (ATP), que já havia sido isolado de músculo, por Lohmann, em 1929. Nos anos subsequentes elucidou-se sua estrutura e o ATP mostrou-se ser um composto rico de energia existente em células de animais, plantas e microrganismos, com a função de armazenar a energia advinda das reações exergônicas (Fig. 8.3). A energia livre produzida na hidrólise de suas ligações fosfatadas é utilizada nos processos endergônicos da célula.



Fosfato de arginina



Fosfato de creatina

Figura 8.2 – Fosfato de arginina e fosfato de creatina

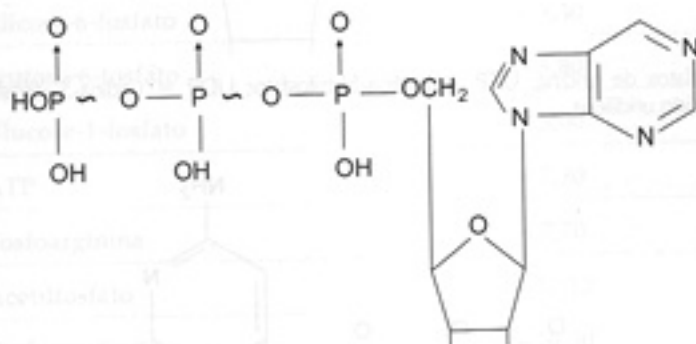


Figura 8.3 – Fosfatos de adenosina; ATP = adenosina-5'-trifosfato; ADP = adenosina-5'-difosfato; AMP = adenosina-5'-monofosfato (ácido adenílico)

Apesar de ser tão importante, o ATP existe nos músculos em diminuta concentração, uma vez que ele é parte do reservatório de compostos ricos de energia, tais como os “fosfogênicos”, que são a fosfocreatina nos vertebrados e fosfoarginina nos invertebrados. A reação de formação de fosfogênio é a “reação de Lohman”, pois foi Lohman quem demonstrou que essas substâncias estão em equilíbrio com ATP:



O valor ΔG° dessa reação é pequeno, uma vez que K aproxima-se da unidade. Isso tem dois significados:

- a energia passa facilmente de ATP para a creatina;
- a reação se dá nos dois sentidos, dependendo da concentração dos reagentes.

Há outros compostos que, como o ATP, possuem também fósforo lábil: os fosfatos de uridina, de citidina e de guanosina. Esses compostos, por hidrólise de seus grupos fosfato, liberam energia livre. Se bem que ATP seja o reagente mais comum dentre os fosfonucleosídeos, UTP, CTP e GTP (Figs. 8.4; 8.5; 8.6) são também importantes respectivamente no metabolismo de açúcares, na biossíntese de lipídeos e na oxidação de ácido α -cetoglutarico.

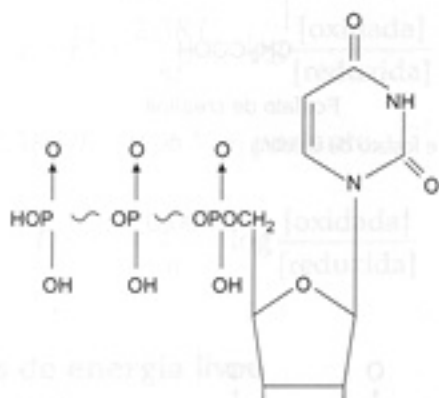


Figura 8.4 – Fosfatos de uridina: UTP = uridina-5'-trifosfato; UDP = uridina-5'-difosfato; UMP = uridina-5'-monofosfato (ácido uridílico)

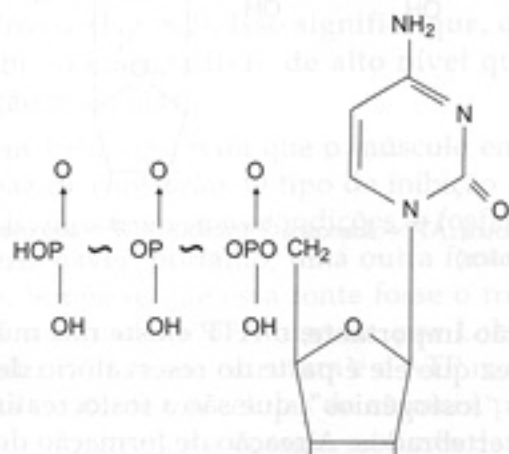


Figura 8.5 – Fosfatos de citidina: CTP = citidina-5'-trifosfato; CDP = citidina-5'-difosfato; CMP = citidina-5'-monofosfato (ácido citidílico)

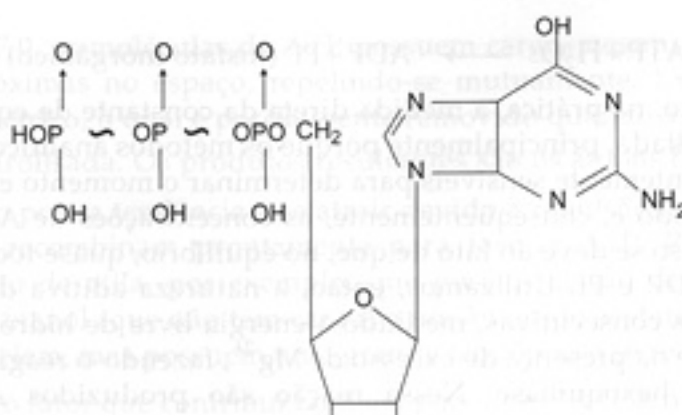


Figura 8.6 – Fosfatos de guanosina; GTP = guanosina-5'-trifosfato; GDP = guanosina-5'-difosfato; GMP = guanosina-5'-monofosfato (ácido guanidílico)

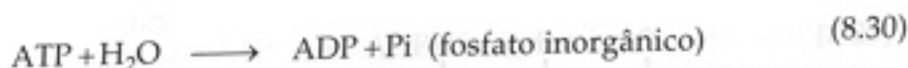
Note-se que, nas fórmulas estruturais indicadas, o sinal (~) indica ligação rica de energia. Essa ligação é também encontrada em outros compostos, fosfatados ou não. A Tab. 8.4 mostra os valores de energia livre-padrão de hidrólise de alguns compostos fosforilados.

Tabela 8.4 – Energia livre-padrão de hidrólise de compostos fosforilados

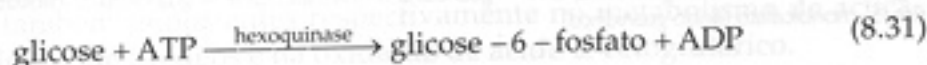
COMPOSTO	ΔG° (kcal)
Glicerol-1-fosfato	- 2,20
Glicose-6-fosfato	- 3,30
Frutose-6-fosfato	- 3,80
Glucose-1-fosfato	- 5,00
ATP	- 7,30
Fosfoarginina	- 7,70
Acetilfosfato	- 10,10
Fosfocreatina	- 10,30
1,3-difosfoglicerato	- 11,80
Fosfoenolpiruvato	- 14,80

8.3.1 – Energia livre de hidrólise do ATP

A medida da energia livre de hidrólise do ATP deveria ser realizada, em princípio, a partir da eq. (8.30), utilizando-se a Eq. (8.27).

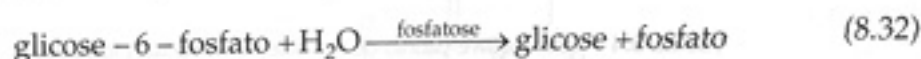


Entretanto, na prática, a medida direta da constante de equilíbrio dessa reação é dificultada, principalmente porque os métodos analíticos disponíveis não são suficientemente sensíveis para determinar o momento em que o equilíbrio foi atingido e, conseqüentemente, as concentrações de ATP, ADP e Pi nesse ponto. Isso se deve ao fato de que, no equilíbrio, quase todo o ATP é hidrolizado a ADP e Pi. Utilizamos, então, a natureza aditiva dos valores de ΔG° de reações consecutivas, medindo a energia livre de hidrólise do ATP a pH 7,0 a 37°C e na presença de excesso de Mg^{2+} , fazendo-o reagir com glicose, na reação de hexoquinase. Nessa reação são produzidos ADP e glicose-6-fosfato:



$$(K' = 661; \Delta G_1^\circ = 4,00 \text{ kcal})$$

Em seguida mede-se a constante de equilíbrio e o valor de ΔG° da hidrólise de glicose-6-fosfato, catalisada por fosfatase:



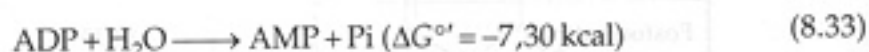
$$(K' = 171; \Delta G_2^\circ = 3,30 \text{ kcal})$$

Somando as Eqs. (8.31) e (8.32) tem-se a equação da hidrólise de ATP. Desde que os valores de ΔG° de ambas as reações são aditivos, pode-se calcular a energia livre-padrão de ATP:

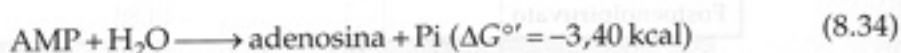
$$\Delta G_{\text{ATP}}^\circ = \Delta G_1^\circ + \Delta G_2^\circ = -4,00 + (-3,30) = -7,30 \text{ kcal}$$

A reação é extremamente exergônica.

O grupo fosfato terminal de ADP também tem o mesmo nível de energia livre de hidrólise:



Por sua vez, o grupo fosfato de AMP tem baixa energia livre de hidrólise:



Observe-se que as ligações entre os grupos fosfato são de anidrido, enquanto que a ligação entre fosfato e ribose é ligação de éster. Essa diferença parece estar nas propriedades tanto dos reagentes quanto dos produtos, pois a energia livre-padrão de hidrólise é uma medida da diferença entre as energias livres dos reagentes e dos produtos.

Em pH 7,0, as moléculas de ATP possuem cargas negativas que se situam muito próximas no espaço, repelindo-se mutuamente. Existe, portanto, um estresse elétrico, o qual é parcialmente removido quando a ligação fosfato terminal é hidrolisada. Os produtos resultantes são os ânions HPO_4^- e ADP^{3-} , que têm muito pouca tendência a se atrair devido à repulsão de cargas, e portanto não se recombinam prontamente para formar ATP. Por outro lado, quando acetato de etila, por exemplo, que possui ligação de éster, hidrolisa-se, produz etanol (que não tem carga) e um ânion de acetato. Esses produtos não se repelem, mas possuem uma grande tendência a se recombinar.

Um outro fator que contribui também para que o ATP tenha uma grande energia livre-padrão de hidrólise negativa é que os dois produtos de sua hidrólise são estabilizados como "híbridos de ressonância". Os elétrons em torno dos átomos de fósforo e de oxigênio do fosfato terminal de ATP competem entre si pelas orbitais que possuem conteúdo energético mais baixo. Como resultado dessa ressonância competitiva, nem todos os elétrons da ligação pirofosfórica no ATP intacto podem atingir níveis tão baixos como os que existem em ADP e HPO_4^- . Por outro lado, quando acetato de etila se hidrolisa, o etanol que se forma não sofre estabilização significativa. O ATP, sendo um anidrido ácido, possui uma característica ressonância competitiva, ou de oposição, e portanto tende a ter valores de ΔG° bastante negativos.

O termo "energia de ligação fosfato" usado pelos bioquímicos não deve ser confundido com o termo "energia de ligação" utilizado pelos físico-químicos. Esse último termo designa a energia exigida para "quebrar" uma ligação entre dois átomos. Em Bioquímica, o termo "energia de ligação fosfato" é a diferença entre a energia livre dos reagentes e a dos produtos, quando um composto fosforilado é hidrolisado produzindo fosfato inorgânico.

Um exame mais atento da Tab. 8.4 nos indica que os compostos com valores mais negativos sofrem hidrólise mais completa no equilíbrio, ou seja, possuem uma constante de equilíbrio maior do que aqueles com valores menos negativos. Ou seja, os mais negativos tendem a perder grupos fosfato mais prontamente do que os menos negativos. Note-se, ainda, pelos dados da tabela, que não há uma linha divisória entre compostos de alta energia livre de hidrólise e os de baixa energia. Há compostos que, inclusive, possuem energia livre de hidrólise mais negativa do que a do ATP, o qual tem um valor intermediário na escala termodinâmica. A importância do ATP reside na função que o sistema ATP/ADP desempenha na célula, como um carregador intermediário de grupos fosfato, originados em compostos de alta energia livre de hidrólise, para compostos de baixo nível de energia.

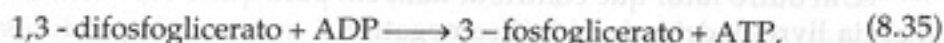
8.3.2 – Compostos de alta energia livre de hidrólise

Os compostos fosforilados de alta energia livre de hidrólise podem ser divididos em duas classes: a dos compostos produzidos durante a degradação

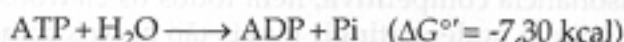
de moléculas e a dos compostos que são reservatório de ligações fosfatadas ricas de energia.

8.3.2.1 – Compostos produzidos durante a degradação de moléculas

Na glicólise (ver Cap. 6) o fosfato do C-1 da molécula do ácido 1,3-difosfoglicérico é transferido para a molécula do ADP, formando-se ATP e ácido 3-fosfoglicérico em uma reação catalizada pela enzima fosfogliceroquinase. Conhecendo-se a constante de equilíbrio da reação de transferência de fosfato, calcula-se a energia livre-padrão de hidrólise do ácido difosforilado. Em pH 7,0 tem-se:



$$(K' = 2070; \Delta G^{\circ'} = -4,50 \text{ kcal})$$



Aplicando-se o princípio da adição para essa sequência de reações, a energia livre-padrão de hidrólise do grupo 1-fosfato do ácido será

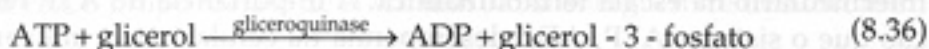
$$\Delta G^{\circ'} = -7,30 + (-4,50) = -11,8 \text{ kcal}$$

8.3.2.2 – Compostos que são reservatórios de ligações fosfatadas ricas de energia

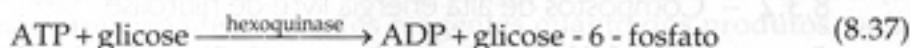
São os fosfogênios, já discutidos. A natureza rica de energia de fosfoar-ginina e fosfocreatina reside no fato de que os grupos guanidino e fosfato sofrem uma constrição em sua estabilização ressonante normal. Quando o grupo fosfato é hidrolisado, essa constrição diminui, e os produtos de reação formam híbridos de ressonância estáveis.

8.3.3 – Compostos de baixa energia livre de hidrólise

Quando ésteres fosfóricos de álcoois orgânicos sofrem hidrólise, o álcool livre, em pH 7,0, possui pouca ou nenhuma estabilidade ressonante. Existem enzimas, como a gliceroquinase e a hexoquinase, que catalisam a transferência de grupos fosfato de ATP para aceptores específicos para formar compostos de baixa energia livre de hidrólise:



$$(\Delta G^{\circ'} = -5,10 \text{ kcal})$$



$$(\Delta G^{\circ'} = -4,00 \text{ kcal})$$

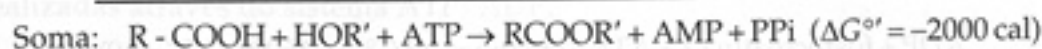
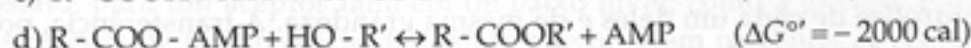
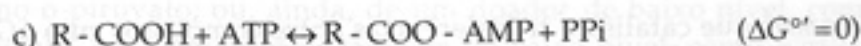
Devido ao fato de os valores de $\Delta G^{\circ'}$ dessas reações serem menos negativos do que para a hidrólise de ATP, ambas as reações tendem para a direita.

8.3.4 – Transferência enzimática de grupos fosfato

O mecanismo pelo qual uma reação exergônica dirige um processo endergônico pode ser exemplificado pela síntese de um éster e a hidrólise simultânea de ATP em AMP + Pi:

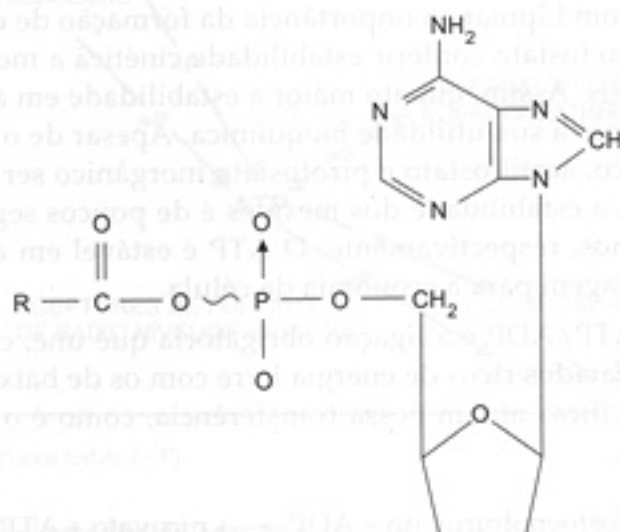


No caso presente, a reação (b) somente guiará a reação (a) se for conjugada a um intermediário comum, como no seguinte caso hipotético:



P Pi = pirofosfato inorgânico

O intermediário R-COO-AMP é um aciladenilato (Fig. 8.7) e é um anidrido entre o ácido carboxílico e o fosfato do ácido adenílico.



Aciladenilato (RCOO - AMP)

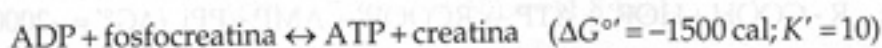
Figura 8.7 – Aciladenilato (RCOO-AMP)

Na formação de um aciladenilato, rompe-se a ligação entre o pirofosfato e a porção adenilica do ATP, sendo o produto final um pirofosfato e não um ortofosfato. O valor ΔG° dessa ligação é algo menor do que o valor da primeira ligação do ATP. Devido à pequena variação no valor da energia livre, a síntese de um éster orgânico através desse mecanismo não é muito favorecida. Os destinos metabólicos do pirofosfato parecem não ser muitos. Há, entretanto, pirofosfatases que catalisam a hidrólise de pirofosfatos, produzindo ortofosfato, com $\Delta G^{\circ} = -7.000$ cal. Por conseguinte, a hidrólise do pirofosfato formado durante a síntese de um éster torna essa síntese irreversível. Casos deste tipo englobam a síntese de nucleotídeos, polinucleotídeos e ligações de peptídeos e a ativação de ácidos graxos.

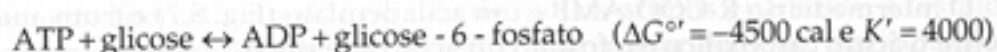
8.3.4.1 – Quinases

As quinases são enzimas que catalizam a transferência de fosfato do ATP para um aceptor. São divididas em duas grandes categorias, conforme segue:

a) Quinases que catalisam transferências entre compostos cujo ΔG° para a hidrólise de cada um deles é da mesma grandeza. A transferência, portanto, pode-se dar em ambos os sentidos:

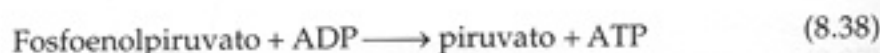


b) Quinases que catalisam transferência com formação de compostos de baixa energia de hidrólise. A reação, com toda probabilidade, é irreversível:

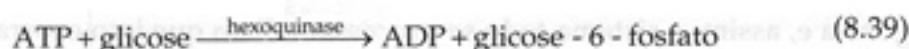


De acordo com Lipman, a importância da formação de ésteres fosfóricos reside no fato de o fosfato conferir estabilidade cinética a moléculas termodinamicamente lábeis. Assim, quanto maior a estabilidade em água de um éster fosfórico, maior será a sua utilidade bioquímica. Apesar de o ΔG° de hidrólise de anidrido acético, acetilfosfato e pirofosfato inorgânico ser da mesma grandeza para os três, a estabilidade dos mesmos é de poucos segundos, algumas horas e alguns anos, respectivamente. O ATP é estável em água, o que é de considerável vantagem para a economia da célula.

O sistema ATP/ADP é a ligação obrigatória que une, como uma ponte, os compostos fosfatados ricos de energia livre com os de baixa energia. Fosfo-transferases específicas atuam nessa transferência, como é o caso de quinase pirúvica (Eq. 8.38).



O ATP formado nessa reação passa a ser um doador de grupo fosfato em uma outra reação enzimática, formando um composto de baixa energia:



O resultado é a transferência de um grupo fosfato de um doador de alto nível para um aceptor de baixo nível de energia, produzindo a seguinte reação total:



Desse modo, o conteúdo de energia da molécula de glicose foi elevado ao mesmo nível dos resíduos glicosil do glicogênio.

Como indica a Fig. 8.8, na cadeia de reações que transfere energia na célula o grupo fosfato nunca é transferido diretamente de um conjunto de alto nível para um aceptor de baixo nível. Não se conhecem enzimas que catalisem essas transferências diretas. Do mesmo modo, não existem nas células enzimas que transferem grupos fosfato de um doador rico de energia como, por exemplo, ácido 1,3-difosfoglicérico, para outro aceptor também rico de energia como o piruvato; ou, ainda, de um doador de baixo nível, como o glicérol-3-fosfato, para um aceptor também de baixo nível, como a glicose. É que todas as reações de transferência de fosfato que ocorrem na célula devem ser realizadas através do sistema ATP/ADP.

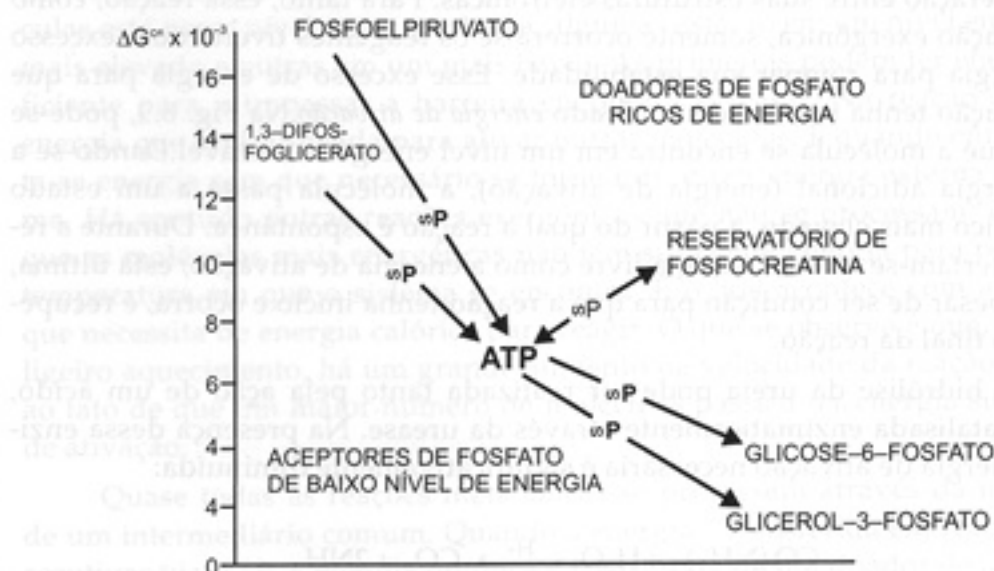
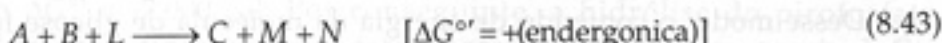
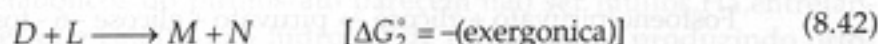
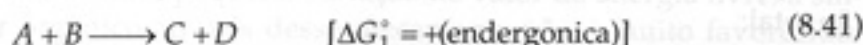


Figura 8.8 – Fluxo de grupos fosfato (P)

8.3.5 – Acoplamento de reações

Às vezes uma reação endergônica, que não se processa por si mesma devido a um aumento na energia livre, pode ser acoplada com uma reação exer-

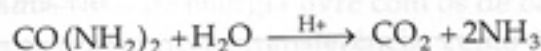
gônica e, assim, o sistema todo se processará. Para que isso ocorra, deve haver um intermediário comum a ambas as reações. Assim,



D , formado (Eq.8.41) é um reagente para a reação seguinte (Eq.8.42) e, desse modo, C será formado a partir de A e B (Eq. 8.43). Esse caso pode ser considerado como um exemplo do princípio de Le Chatelier, segundo o qual uma reação pode completar-se pela remoção de um dos produtos. O composto D é aquele que é removido pelo seu acoplamento com uma segunda reação.

Nem sempre uma reação espontânea necessariamente ocorre. Assim, a oxidação de glicose, que é uma reação com ΔG negativo, não se efetua pela simples exposição de glicose ao O_2 atmosférico; pelo contrário, é preciso que ambas as moléculas reagentes se choquem com energia suficiente para que haja interação entre suas estruturas eletrônicas. Para tanto, essa reação, como toda reação exergônica, somente ocorrerá se os reagentes tiverem um excesso de energia para romper sua estabilidade. Esse excesso de energia para que uma reação tenha início é denominado *energia de ativação*. Na Fig. 8.9, pode-se notar que a molécula se encontra em um nível energético estável. Dando-se a ela energia adicional (energia de ativação), a molécula passa a um estado energético mais elevado, a partir do qual a reação é espontânea. Durante a reação libertam-se tanto a energia livre como a energia de ativação; esta última, pois, apesar de ser condição para que a reação tenha início e ocorra, é recuperada no final da reação.

A hidrólise da uréia pode ser realizada tanto pela ação de um ácido, como catalisada enzimaticamente através da urease. Na presença dessa enzima a energia de ativação necessária é significativamente diminuída:



$$E_a = 24,6 \text{ kcal / mol}$$



$$E_a = 6,8 \text{ kcal / mol}$$

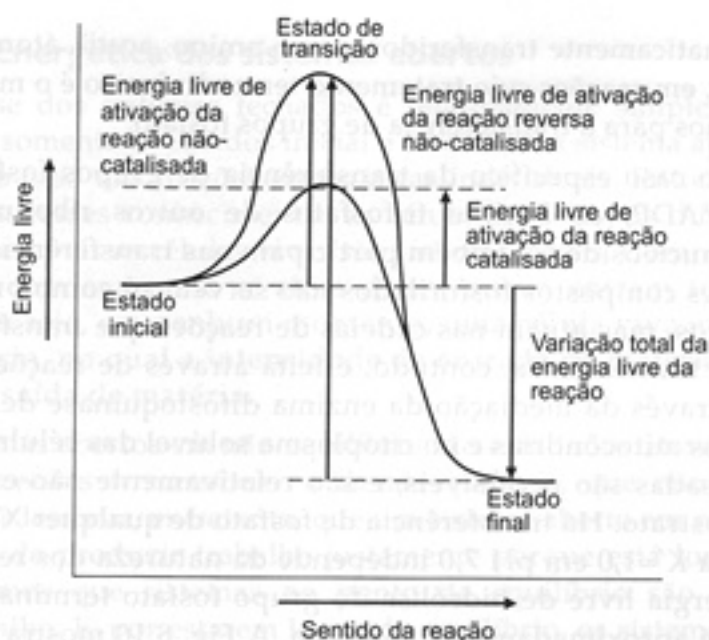


Figura 8.9 – Ação da enzima no decréscimo do valor da energia de ativação de uma reação bioquímica.

A necessidade de energia de ativação pode ser explicada pela distribuição estatística de Maxwell-Boltzmann: quando se diz que uma população de moléculas está em um nível de energia, quer-se dizer que a maioria das moléculas está nesse nível e que, portanto, algumas estarão em um nível energético mais elevado e outras em um mais baixo. As primeiras podem ter energia suficiente para ultrapassar a barreira energética e reagir. Na reação libertam energia que será utilizada para ativar outras moléculas. É quando então liberta-se energia sem que necessário se torne introduzir energia externa ao sistema. Há contudo outras reações exergônicas que não se processam, uma vez que as moléculas mais energéticas não têm suficiente energia para reagir, na temperatura em que o sistema se encontra. É o que acontece com a glicose, que necessita de energia calórica para reagir. O que se observa é que, com um ligeiro aquecimento, há um grande aumento na velocidade da reação, devido ao fato de que um maior número de moléculas passa a ter energia superior à de ativação.

Quase todas as reações metabólicas se processam através da mediação de um intermediário comum. Quando a energia é transferida em reações consecutivas via ATP, a energia química é transferida de um doador de alto nível energético para o ADP, e é conservada como ATP, que é um dos produtos da reação. Na reação subsequente, o ATP passa a atuar como substrato, transferindo seu grupo fosfato terminal para um aceptor, o qual aumenta seu conteúdo energético. Entretanto, muitas reações consecutivas não requerem grupos fosfato ou o ATP como intermediários comuns. Outros grupos funcionais são

também enzimaticamente transferidos, como amino, acetil, átomos de hidrogênio e outros, em reações cujo tratamento termodinâmico é o mesmo que até agora estudamos para a transferência de grupos fosfato.

Ainda no caso específico da transferência de grupos fosfato, além do sistema ATP/ADP, os 5'-di e trifosfatos de outros ribonucleosídeos e 2-desoxirribonucleosídeos também participam nas transferências de energia na célula. Esses compostos fosforilados não servem só como precursores de ácidos nucleicos, mas atuam nas cadeias de reações que transferem energia química. Essa transferência, contudo, é feita através de reações conectadas com o ATP através da mediação da enzima difosfoquinase de nucleosídeo, encontrada nos mitocôndrios e no citoplasma solúvel das células. As reações por ela catalisadas são reversíveis, e são relativamente não-específicas em relação ao substrato. Há transferência de fosfato de qualquer XTP para qualquer XDP. Sua $K' = 1,0$ em pH 7,0 independe da natureza dos reagentes, uma vez que a energia livre de hidrólise do grupo fosfato terminal de todos os 5'-trifosfatos é aproximadamente a mesma. A Fig. 8.10 mostra como os grupos fosfato ricos de energia entram nas várias vias de biossíntese, através dos 5'-trifosfatos.

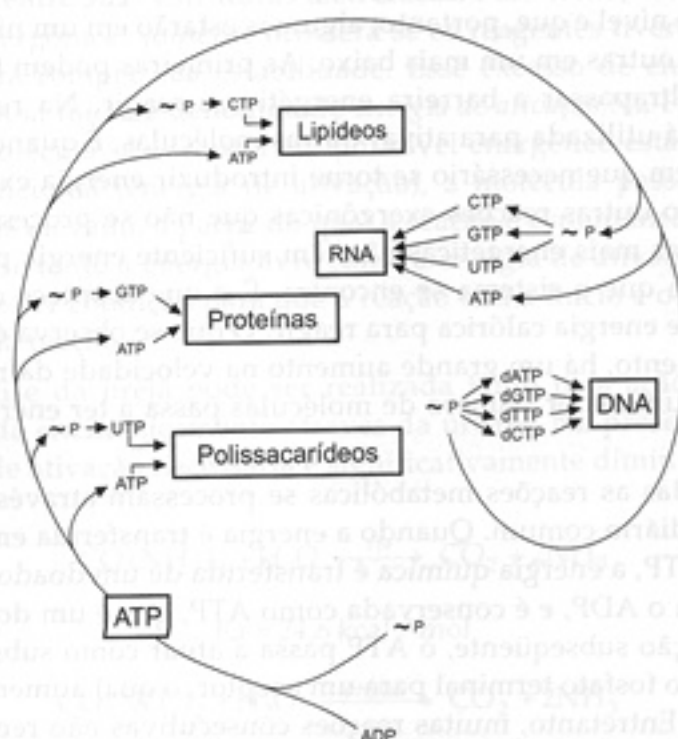


Figura 8.10 – Nucleosídeos-trifosfatos como transportadores de grupos fosfatos ricos de energia

8.4 – Energética dos sistemas abertos

A análise dos sistemas fechados é relativamente simples, porque são considerados somente os estados inicial e final de um sistema após alcançar o equilíbrio. É o caso das reações enzimáticas individuais. Entretanto, quando se tenta aplicar esses conhecimentos às células intactas, as dificuldades tornam-se grandes, pois as células vivas são *sistemas abertos*. Como tais, elas trocam matéria com seu meio e, além disso, nunca entram totalmente em equilíbrio. Ou seja, em nenhum momento, uma célula viva existe em regime estacionário, no qual a intensidade de entrada de matéria é igual à intensidade de saída de matéria.

Os sistemas abertos em não-equilíbrio são estudados através da *termodinâmica dos processos irreversíveis ou do não-equilíbrio*, que não discutiremos aqui. Devemos lembrar, entretanto, que um sistema aberto em regime estacionário é capaz de produzir trabalho justamente porque está longe do equilíbrio. Já sabemos que sistemas no ponto de equilíbrio são incapazes de produzir trabalho. E, por estarem longe do equilíbrio, os sistemas abertos podem ser controlados e regulados. Além do mais, como bem lembra Lehninger, “no formalismo da Termodinâmica do não-equilíbrio, a condição de regime estacionário, que é característica de toda máquina que está funcionando bem, pode ser considerada como o *estado ordenado* de um sistema aberto, ou seja, o estado no qual há um mínimo de produção de entropia”. Ainda mais: todo o processo de biossíntese de macromoléculas e do desenvolvimento celular é uma poderosa força antientrópica. Como ressalta Katchalsky, “desde que não se pode escapar do *destino entrópico* de todos os fenômenos, os organismos vivos, mantendo um regime estacionário, produzem entropia com um mínimo de intensidade”.

Literatura recomendada

- BRAY, H.G. & WHITE, K. *Cinética y termodinâmica en bioquímica*. Zaragoza, Ed. Acribia, 1958.
- DAWES, E.A. *Quantitative problems in Biochemistry*. Edimburgo, E.S. Livingstone Ltd., 1967.
- INGRAHAM, L.L. & PARDEE, A.B. Free energy and entropy in metabolism. In: *Metabolic Pathways* (Greenberg, D.M., ed.). 3.ed. n.1, p.2-45. Nova York, Academic Press, 1967.
- KAPLAN, N.O. & KENNEDY, E.P. *Current aspects of biochemical energetics*. Nova York, Academic Press, 1966.

KLOTZ, I. **Energy changes in biochemical reactions**. Nova York, Academic Press, 1967.

KREBS, H.A. & KORNBERG, H.L. **Energy transformations in living matter**. Berlim, Spring-Verlag OHG, 1957.

LEHNINGER, A.L. **The mitochondrion**. Nova York, W.A. Benjamin, 1964.

LEHNINGER, A.L. **Bioenergetics**. Nova York, W.A. Benjamin, Inc. 1965.

LEHNINGER, A.L. **Principles of Biochemistry**. Nova York, Worth Publs., Inc., 1982

LIPMANN, F. **Metabolic generation and utilization of phosphate bond energy**. *Advances in Enzymology*, v.1, 99p, 1941.

MORRIS, J.G. **A biologist's physical chemistry**. Londres. Edward Arnold (Publs.) Ltd., 1968.

PIMENTEL, G.C. & SPRATLEY, R.D. **Understanding chemical thermodynamics**. San Francisco, Holden-Day, Inc., 1969.

RACKER, E. **Mechanisms in bioenergetics**. Nova York, Academic Press, 1965.

SEGEL, I.E. **Biochemical calculations**. Nova York, John Wiley & Sons, Inc., 1968.

estacionário, que é característica de toda máquina que está funcionando bem, pode ser considerada como o estado natural de um sistema aberto, ou seja, o estado no qual há um mínimo de produção de entropia. Ainda mais, todo o processo de biosíntese de macromoléculas e do desenvolvimento celular é uma poderosa força entropiônica. Como ressaltou Katchalsky, "desde que não se pode escapar do destino entropico de todos os fenômenos, os organismos vivos, mantendo um regime estacionário, produzem entropia com um mínimo de intensidade".



BRAY, H.C. & WHITE, K. **Clínica y termodinámica en fisiología**. Zaragoza, Ed. Acribia, 1958.

DAWE, E.A. **Quantitative problems in biochemistry**. London, E.C. Livingston, Ltd., 1967.

INGRAM, J.L. & PARDEE, A.B. **Free energy and entropy in metabolism**. In: *Metabolic Pathways* (Greenberg, D.M., ed.), 2nd ed., p. 2-12. Nova York, Academic Press, 1967.

KAPLAN, N.O. & KENNEDY, E.P. **Current aspects of biochemical energetics**. Nova York, Academic Press, 1968.

9 PROCESSO BIOTECNOLÓGICO INDUSTRIAL GENÉRICO

Walter Borzani

Uma vez completado o exame de *fundamentos* indispensáveis ao estudo de problemas de *engenharia* (principal objetivo do Volume 2) e de aspectos de *tecnologia* (reunidos nos volumes 3 e 4) inerentes aos processos biotecnológicos industriais, parece-nos aconselhável apresentar, aos alunos que estão se iniciando no campo da Biotecnologia Industrial, uma representação esquemática de um processo biotecnológico industrial genérico, procurando destacar as principais etapas que o constituem.

O aluno poderá assim, quando do estudo de um tópico específico, situar a posição desse tópico no contexto geral do processo que esteja sendo examinado.

Em qualquer processo biotecnológico industrial, o elemento central é o *reator*, pois nele se desenvolvem, devidamente controladas, as transformações que nos interessam.

Isso não quer dizer que o reator constitua a etapa mais importante do processo. Para que o resultado que se tem em vista seja alcançado, dois outros conjuntos de operações devem ser também cuidadosamente considerados, a saber:

- 1) Os *tratamentos iniciais* ("Upstream processes"), que antecedem a operação no reator e cuja finalidade é colocar o sistema nas condições previamente escolhidas, para que as transformações, no reator, se desenvolvam a contento;
- 2) Os *tratamentos finais* ("Downstream processes"), que englobam a separação e a purificação dos produtos e subprodutos obtidos, bem como o tratamento dos resíduos formados.

A Fig. 9.1 representa, esquemática e resumidamente, o que foi dito até este momento.

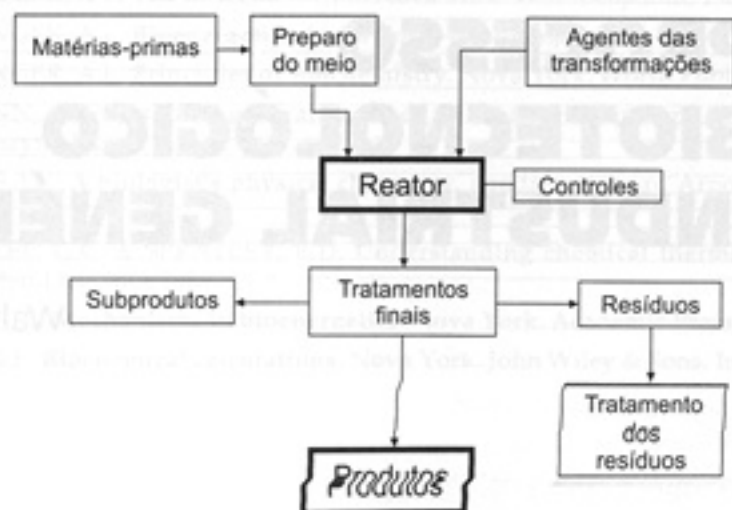


Figura 9.1 - Representação esquemática de um processo biotecnológico industrial genérico.

Quando os agentes das transformações que ocorrem no reator são ou uma enzima (purificada ou não), ou uma mistura de enzimas (também mais ou menos purificadas), ou ainda células inativadas ou mortas (que, neste caso, funcionam como simples suportes das enzimas), o processo recebe a denominação genérica de *processo enzimático*.

Por outro lado, se os agentes das transformações são microrganismos vivos, de modo que as reações que se desenvolvem no reator são conseqüências da atividade vital das células microbianas, o processo é denominado *processo fermentativo*. Nesse caso, o reator é, muito freqüentemente, também chamado *fermentador* ou *dorna*.

Cumpra não esquecer que a atividade vital dos microrganismos responsáveis por um processo fermentativo é sempre o resultado de considerável número de reações enzimáticas. A rigor, portanto, quer nos processos chamados *enzimáticos*, quer nos denominados *fermentativos*, enzimas são, em última análise, os catalisadores das transformações que ocorrem no reator.

Dois casos importantes, que alguns autores englobam também na categoria de processos fermentativos, são aqueles em que os agentes das transformações são ou células de tecidos (animais ou vegetais), ou vírus.

Em que pese o fato de a Fig. 9.1 poder representar, em suas linhas gerais, tanto processos enzimáticos quanto processos fermentativos, parece-nos conveniente, com relação a estes últimos, apresentar mais pormenorizadamente as etapas que os constituem. É o que nos mostra a Fig. 9.2. Cumpra, contudo, informar que nem todos os processos fermentativos industriais com-

preendem *todas* as etapas indicadas na Fig. 9.2. Dependendo do processo considerado, uma ou mais dessas etapas podem não existir, como será visto no Volume 3 desta série Biotecnologia Industrial.



Figura 9.2 – Principais etapas de um processo fermentativo industrial genérico.

10

ALGUMAS APLICAÇÕES INDUSTRIAIS

Walter Borzani

Os dois últimos volumes desta Coleção tratam de examinar, com os pormenores cabíveis em cada caso, vários processos biotecnológicos de interesse industrial.

Parece-nos recomendável, contudo, a apresentação de uma enumeração sucinta de aplicações da Biotecnologia no setor industrial, para que o aluno possa, desde já, fazer uma idéia geral da importância da Biotecnologia Industrial em nossos dias.

Convém destacar, porém, que a relação de exemplos considerada neste capítulo não só não é completa, como também não pretende estabelecer qualquer ordem de importância relativa dos processos que serão apontados. Mesmo porque a dinâmica inerente aos complexos sistemas sócio-econômicos, tanto em nível regional como em nível mundial, pode fazer com que um dado processo, hoje pouco relevante em uma determinada região, passe a ser, às vezes a prazo relativamente curto, de fundamental importância nesta mesma região, e vice-versa.

Processos fermentativos são utilizados industrialmente na produção de bebidas alcoólicas (cervejas, vinhos, sidras, aguardentes), vinagres, etanol, ácidos orgânicos (cítrico, láctico, fumárico, giberélico), solventes (butanol, acetona, isopropanol), vitaminas (riboflavina, ácido ascórbico, cobalaminas, ergosterol), antibióticos (penicilinas, estreptomicina, tetraciclina, griseofulvin), polissacarídeos (dextrânicos), aminoácidos (lisina, ácido glutâmico), esteróides modificados (por hidroxilação, hidrogenação, desidrogenação, hidrólise, esterificação, isomerização, aminação, ruptura de cadeia lateral), leites fermentados (iogurte, leites acidófilos), manteigas, queijos, pickles, chucrute, azeitonas, pão, cacau, lipídeos, ensilagem, várias proteínas. Metais diversos (cobre, zinco, prata, ouro, urânio) podem ser obtidos por fermentação, a partir de miné-

rios de baixo teor. Os processos de tratamento biológico de resíduos (águas residuárias, lixo) são, também, processos fermentativos. Não podem deixar de ser citados, para encerrar esta relação, os processos fermentativos que têm por objetivo a produção industrial de microrganismos que, por sua vez, podem ser utilizados:

1) Como agentes de outros processos fermentativos (leveduras para panificação, leveduras para produção de etanol, bactérias para tratamento biológico de efluentes);

2) Na alimentação do homem e de animais, quer na forma de concentrados protéico-vitamínicos (algas, leveduras do gênero *Candida*), quer no enriquecimento protéico, principalmente pela ação de bolores, de vários materiais (farinhas, farelos, resíduos da industrialização de frutas);

3) Como fixadores de nitrogênio do ar na agricultura (bactérias do gênero *Rhizobium*);

4) No controle biológico de pragas (bactérias do gênero *Bacillus*);

5) Na produção de vacinas (bactérias dos gêneros *Corynebacterium*, *Bordetella*, *Neisseria*, *Mycobacterium*).

Quanto à utilização de enzimas, principalmente em meio aquoso, como agentes de transformações em escala industrial, cumpre ressaltar que sua importância vem crescendo acentuadamente. Citemos, sempre de maneira resumida, algumas indústrias em que são utilizados preparados enzimáticos para fins específicos: cervejaria (amilases, amiloglicosidase, papaína), panificação (amilases, pepsina, lipases), produção de edulcorantes (alfaamilase, invertase, glicose-isomerase), indústria têxtil (alfaamilase, celulasas), produção de vinhos e sucos (pectinases), indústria do leite (lactase, catalase, lipases), indústria farmacêutica (celulasas, bromelina, penicilina-acilase, pancreatina), indústria de carnes (papaína), fabricação de queijos (reninas), produção de detergentes (proteases), indústria do pescado (proteases), curtume (pancreatina).

Literatura recomendada

1) ILLANES, A. *Biotecnologia de Enzimas*. Ediciones Universitarias de Valparaíso de la Universidad Católica de Valparaíso, Valparaíso (1994).

2) PRESCOTT, S.C. & DUNN, C.G. *Industrial Microbiology*. McGraw-Hill, Nova York (1959).

3) REED, G. *Prescott & Dunn's Industrial Microbiology*. The AVI Publishing Company, Westport (1982).

4) REHM, H.J. & REED, G. *Biotechnology* (Coleção de oito volumes publicados a partir de 1981). Verlag Chemie, Weinheim.

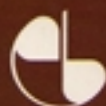
BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL

Esta edição, revista e ampliada, da série Biotecnologia Industrial, é uma contribuição de grande importância teórica e prática para os múltiplos temas abrangidos pelo assunto. É uma obra toda ela elaborada por autores nacionais, coordenados por quatro professores de vasta experiência, representando a condição atual dos estudos e aplicações subordinados ao campo que dá o título à série.

O estudo da Biotecnologia Industrial não deve ser entendido como apenas uma descrição, mais ou menos pormenorizada, de processos biotecnológicos de interesse prático. Em que pesem a necessidade e a importância dessa descrição, não é ela suficiente para formar a almejada estrutura mental do futuro profissional.

Para que o aluno possa, de um lado, compreender o porquê de várias recomendações indispensáveis ao bom andamento das transformações desejadas e, por outro, adquirir uma formação que lhe possibilite enfrentar, racionalmente, questões que poderão se apresentar em sua futura atividade profissional, deve ele possuir um adequado conhecimento de FUNDAMENTOS indispensáveis. Tal é o objetivo primordial deste primeiro volume.

Nove profissionais, pertencentes aos quadros docentes da Universidade de São Paulo e do Centro Universitário do Instituto Mauá de Tecnologia, reuniram, neste volume, tópicos fundamentais de microbiologia, genética, engenharia genética, enzimologia, caminhos metabólicos, cinética e termodinâmica de reações enzimáticas, além de, sucintamente, apresentar as etapas que constituem um processo biotecnológico industrial genérico e apontar alguns exemplos com o único objetivo de dar, ao aluno, uma idéia do campo de atuação da biotecnologia industrial.



EDITORA EDGARD BLÜCHER LTDA

ISBN 978-85-212-0278-3



1 788521 202783